

PRODUKTION, CHARAKTERISIERUNG UND IMMOBILISIERUNG
VON NATIV UND REKOMBINANT HERGESTELLTEN
FRUCTOSYLTRANSFERASEN ZUR SYNTHESE NEUARTIGER
FRUCTOOLIGOSACCHARIDE

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Sven Götze
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening

2. Referent: Prof. Dr. Adrian Schumpe

eingereicht am: 07.01.2015

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.06.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

Publikationen

Zuccaro, A., Götze, S., Kneip, S., Dersch, P., Seibel, J. Tailor-Made fructooligosaccharides by a combination of substrate and genetic engineering. *ChemBioChem*. 2008; 9: 143 - 149.

Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D. Seibel, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis - mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J*. 2007; 407(2): 189 - 198.

Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H.J. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr Res*. 2006; 341: 2335 - 2349.

Seibel, J., Moraru, R., Götze, S. Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues. *Tetrahedron*. 2005; 61: 7081 - 7086.

Tagungsbeiträge

Homann, A., Zuccaro, A. Götze, S., Strube, C., Dersch, P., Heinz, D., Seibel, J. Novel fructooligosaccharides as pharma-/nutraceuticals. Poster; European Bioperspectives, Hannover, 2008.

Götze, S., Zuccaro, A., Kneip, S., Dersch, P., Seibel, J. Functional characterization of the fructooligosaccharide synthesis by the recombinant produced β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* AB1.13. Poster; P 4.45, European Bioperspectives, Köln, 2007.

Seibel, J., Götze, S., Biedendieck, R., Homann, A., Buchholz, K. Kinetic studies of a novel fructosyltransferase from *Bacillus megaterium* provide insights into the reaction mechanism. Poster; P 2.4, European Bioperspectives, Köln, 2007.

Strube, C.P., Götze, S., Biedendieck, R., Seibel, J., Heinz, D.W. Purification, crystallization and preliminary X-ray analyses of SacB, a fructosyltransferase from *Bacillus megaterium*. Poster; 2.5, European Bioperspectives, Köln, 2007.

Zuccaro, A., Götze, S., Kneip, S., Seibel, J., Dersch, P. Production and characterization of the recombinant β -fructofuranosidase with transfructosylating activity for fructooligosaccharides synthesis by *Aspergillus niger* AB1.13. Poster; 34, 7th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM7), Braunschweig, 2007.

Homann, A., Götze, S., Biedendieck, R., Jahn, D., Buchholz, K., Seibel, J. Characterization and mechanistic insights of a novel fructosyltransferase from *Bacillus megaterium* by site-

directed mutagenesis. Poster; 87, 7th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM7), Braunschweig, 2007.

Götze, S., Moraru, R., Homann, A., Hecht, H.J., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Buchholz, K., Seibel, J. Structural dockings of sucrose analogues in the implementation of transfructosylation reactions. Poster; 106, 7th Carbohydrate Bioengineering Meeting (CBM7), Braunschweig, 2007.

Hillringhaus, L., Homann, A., Hellmuth, H., Moraru, R., Götze, S., Beine, R., Seibel, J. Neuartige chemo-enzymatische Glykosylierungsmethoden zur Synthese von Oligosacchariden, Glykopeptiden und Glykokonjugaten. Poster; Jahrestagung Deutscher Katalytiker, Weimar, 2007.

Götze, S., Moraru, R., Homann, A., Hecht, H. J., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Buchholz, K., Seibel, J. Sucrose analogues synthesis with the fructosyltransferase of *B. subtilis* NCIMB 11871 provides mechanistic insights. Poster; 47, 3rd International Congress on Biocataylsis, Hamburg, 2006.

Hellmuth, H., Moraru, R., Beine, R., Götze, S., Buchholz, K., Seibel, J. Novel chemoenzymatic pathways to oligosaccharides, glycopeptides and glycoconjugates. Poster; 89, 3rd International Congress on Biocataylsis, Hamburg, 2006.

Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Jördening, H.J., Na'amnieh, S., Hillringhaus, L. Enzymatic, chemoenzymatic and chemical synthesis of sucrose analogues. Poster; 20.16, BioPerspectives, Wiesbaden, 2005.

Seibel, J., Götze, S., Moraru, R., Jördening, H.J., Buchholz, K., Na'amnieh, S. Synthesis and Isolation of novel Fructooligomers. Poster; 20, Systembiotechnologie für industrielle Prozesse, Braunschweig, 2005.

Seibel, J., Hellmuth, H., Hillringhaus, L., Moraru, R., Götze, S. Chemoenzymatic tools for the synthesis of oligosaccharides, glycopeptides and glycoconjugates. Poster; 6th Carbohydrate Bioengineering meeting (CBM6), Barcelona, Spanien 2005.

Seibel, J., Götze, S., Moraru, R. The power of enzymes in oligosaccharide synthesis. Poster; 2nd International Congress on Biocatalysis, Hamburg, 2004.

Für meinen Vater

Harald Hermann Götze

und meine Großmutter

Irma Erna Weste

„Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.“

(Max Planck)

DANKSAGUNGEN

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Jördening für die Übernahme der Mentorenschaft und das entgegengebrachte Wohlwollen, meine Promotionsschrift zu betreuen. Die fachliche Kompetenz in wissenschaftlichen Diskussionen, auch mit Herrn Prof. Dr. Jürgen Seibel und Herrn Prof. Dr. Klaus Buchholz, hat mir viele konstruktive Impulse für die theoretischen und praktischen Aspekte der Arbeit gegeben.

Herrn Prof. Dr. Adrian Schumpe aus dem Institut für Technische Chemie danke ich für die freundliche Übernahme des Co-Referates und die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Herrn Prof. Dr. Rainer Krull aus dem Institut für Bioverfahrenstechnik danke ich besonders für die Übernahme des zweiten Fachprüfers in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Menzel danke ich das konstruktive Arbeitsumfeld am Institut für Technische Chemie. Meinen Arbeitskollegen möchte ich für die gemeinsame Zeit am Institut und für viele Unternehmungen danken, die zu einer abwechslungsreichen und angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Namentlich möchte ich daher Anja Zwerenz, Marwan Zein, Jakob Gabrielczyk, Theresa Herfurth, Clarissa Müller, Dirk Eiting, Anita Scherbarth, Gabi Schirmer, Christa Vogel, Anderas Jeron, Hendrik Hellmuth, Frank Erhardt, Roxana Moraru, Arne Homann, Rafael Beine, Lars Hillringhaus, Malte Timm und Bodo Schmalbruch erwähnen. Ein besonderer Dank geht an Herrn Rolf Harrendorf, der meine skizzierten Laborhilfsmittel in technisch solider Ausführung angefertigt und meinen den experimentellen Alltag erleichtert hat.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Petra Dersch und Dr. Alga Zuccaro für die ergiebige Zusammenarbeit und für die Bereitstellung der β -Fructofuranosidase (Suc1) über das Institut für Mikrobiologie (TU Braunschweig). Im Weiteren konnten durch die Kooperation mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik und mit Herrn Thomas Wucherpfennig Folgeexperimente mit der Suc1 ermöglicht werden. Herrn Prof. Dieter Jahn, Frau Dr. Rebekka Biedendiek und Herrn Dr. Marco Malten aus dem Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig danke ich für ein gutes Kooperationsverhältnis. Dr. rer. nat. Shukrallah Na'amnieh und Alice Pawlowski der Firma X-Zyme aus Düsseldorf, danke ich für die weiterführenden Analysen bei der Arbeit mit der Fructosyltransferase NCIMB 11871 aus *Bacillus subtilis*. Der Arbeitsgruppe NanoBioScience der TU Braunschweig von Prof. Dr. Tinnefeld und besonders Herrn Dr. Thorben Dammeyer und Frau Dr. Dina Grohmann danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den molekularbiologischen Arbeiten zur Umklonierung.

Für die Zusammenarbeit bei der verfahrenstechnischen Produktion der nativen und rekombinanten Enzyme möchte ich mich bei der Nordzucker AG, der Amino GmbH sowie Wolfgang Grassl vom Institut für Biotechnologie der TU Braunschweig bedanken. Darüber hinaus danke ich Dr.-Ing. Ingo Kampen und Frau Dipl.-Ing. Sabrina Zellmer vom Institut für Partikeltechnik für die Hilfe bei der physikochemischen Charakterisierung der Trägermaterialien.

Meiner Familie danke herzlich ich für die umfassende Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit. Ein herzlicher Dank gilt überdies Julia Harjung und Ihrer Familie sowie Daniela Schindler für Ihre umsichtige und motivierende Art. Allen anderen Freunden, die in entbehrungsreicher Zeit zu mir gehalten haben, danke ich ebenso.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Eigenschaften und Funktion von Oligo- und Polysacchariden	3
2.2	Anwendungsmöglichkeiten von Fructooligosacchariden und Fructanen	5
2.2.1	Fructooligosaccharide in der Lebensmittelherstellung.....	6
2.2.1.1	Einsatz von Fructooligosacchariden als Präbiotika.....	7
2.2.1.2	Marktpotential von FOS-Präbiotika in funktionellen Lebensmitteln	8
2.2.2	Einsatz in der Pharmazie.....	9
2.3	Chemische Synthese von Oligosacchariden	10
2.4	Enzymatische Synthese von Oligosacchariden	10
2.4.1	Enzymatische Glycosylierung durch Leloir- und Nicht-Leloir- Glycosyltransferasen	11
2.4.2	Fructosyltransferasen	12
2.4.2.1	Reaktionen von Levansucrasen	14
2.4.2.2	Struktur und Reaktionsmechanismus von Levansucrasen	15
2.4.2.3	Fructosyltransferase SacB aus <i>Bacillus subtilis</i>	17
2.4.3	β -Fructofuranosidasen.....	18
2.4.3.1	β -Fructofuranosidase Suc1 aus <i>Aspergillus niger</i>	20
2.4.4	Herstellung von Saccharoseanaloga mittels Akzeptorreaktionen.....	21
2.5	Enzymkinetische Reaktionsparameter nach dem Modell von Michaelis Menten	23
2.6	Mehrsubstratreaktionen	24
2.6.1	Ping-Pong Mechanismus (Double-Displacement Mechanismus)	25
2.7	Einflussfaktoren auf enzymkatalysierte Reaktionen	25
2.7.1	Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke.....	26
2.7.2	Einfluss der Temperatur	27
2.7.3	Inhibierung.....	28
2.8	Prozessoptimierung zur Gewinnung von Protein aus der Bakterienkultivierung	29
2.8.1	Mikrobielles Wachstum.....	30
2.9	Produktion rekombinanter Proteine mittels <i>Escherichia coli</i>	31
2.9.1	Einfluss der Kultivierungsbedingungen und Medienzusammensetzung	33
2.9.2	Bildung von inclusion bodies.....	34
2.9.3	Solubilisierung und Methoden der Proteinrückfaltung	35
2.10	Aufreinigungsstrategien für Proteine	38
2.11	Immobilisierung	38
2.11.1	Diffusiver Stofftransport bei immobilisierten Biokatalysatoren	40
2.11.2	Matrixeinschluss	41
2.11.3	Adsorption	42

2.11.4	Adsorption an Bentonit	43
2.11.5	Adsorption an Hydroxylapatit	44
2.11.6	Kovalente Anbindung an Eupergit C	45
3	Ziel der Arbeit	46
4	Material und Methoden.....	47
4.1	Gerätschaften und Material	47
4.2	Chemikalien und Enzyme	50
4.2.1	Chemikalien.....	50
4.2.2	Enzyme	50
4.2.2.1	SacB aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871.....	50
4.2.2.2	Suc1 aus <i>Aspergillus niger</i> AB1.13	51
4.2.2.3	Restriktionsenzyme.....	52
4.2.2.4	Enzyme für die Polymerase-Kettenreaktion.....	52
4.2.3	Mikroorganismen und Plasmide.....	52
4.2.3.1	Mikroorganismen.....	52
4.2.3.2	Plasmide	54
4.2.3.3	Oligonukleotide	55
4.3	Molekularbiologische Arbeiten	56
4.3.1	Präparation von Plasmiden.....	56
4.3.2	Bestimmung von DNA-Konzentration durch NanoDrop.....	56
4.3.3	<i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	56
4.3.4	Restiktionsverdau.....	56
4.3.5	Dephosphorylierung	56
4.3.6	Ethanol-fällung.....	57
4.3.7	Klonierung und Polymerase-Kettenreaktion.....	57
4.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten	58
4.3.9	Chloroformextraktion	58
4.3.10	Agarose-Gelelektrophorese	59
4.3.11	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	60
4.4	Mikrobiologische Arbeiten	60
4.4.1	Sterilisation.....	60
4.4.2	Hitzeschock-Transformation von <i>Escherichia coli</i>	60
4.4.3	Native Proteinexpression von SacB aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	61
4.4.4	Heterologe Proteinexpression von SacB mit <i>Escherichia coli</i>	61
4.4.5	Kurzfristige Stammhaltung.....	62
4.4.6	Langfristige Stammhaltung	62
4.4.7	Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte.....	62
4.4.8	Bestimmung der Biotrockenmasse	63
4.4.9	Herstellung von Proteinextrakt mittels Ultraschallaufschluss.....	63
4.5	Methoden zur Proteinaufarbeitung	64
4.5.1	Gewinnung rekombinanter FTF aus inclusion bodies	64
4.5.1.1	Aufarbeitung von inclusion bodies aus rekombinant hergestellter FTF	64

4.5.1.2	Solubilisierung der FTF-haltigen inclusion bodies.....	64
4.5.2	Dialyse der Proteinlösungen.....	65
4.5.3	Aufkonzentrierung und Reinigung von Proteinen.....	66
4.5.3.1	Proteinkonzentrierung durch Zentrifugation.....	66
4.5.3.2	Proteinkonzentrierung durch Querstromfiltration	66
4.5.3.3	Poly-Histidin-Tag Affinitätschromatographie.....	67
4.5.3.4	Strep-Tag / Strep-Tactin Affinitätschromatographie.....	68
4.5.4	Proteinflüssigkeitschromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography)	68
4.5.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	69
4.5.6	Bestimmung der Proteinkonzentration durch NanoDrop	70
4.5.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	71
4.5.8	Gel-Färbung mit Coomassie-Brilliantblau.....	73
4.5.9	Western Blot.....	73
4.5.10	Proteinsequenzierung nach Edman.....	74
4.6	Methoden zur Analyse von Sacchariden.....	74
4.6.1	Quantitativer Nachweis von reduzierenden Zuckern (DNS-Test)	74
4.6.2	Qualitative und Quantitative Analysen mittels Dünnschichtchromatographie (DC).....	75
4.6.3	Quantitative Analyse mittels HPLC	77
4.6.4	Quantitative Analyse mittels HPAEC	77
4.7	Physikalische und chemische Charakterisierung der Reaktionsprodukte.....	78
4.7.1	Schmelzpunktbestimmung.....	78
4.7.2	Massenspektrometrie mittels Elektrospray Ionisierung (ESI/MS)	78
4.7.3	Bestimmung der optischen Aktivität	78
4.7.4	Kohlenhydratanalyse durch Kernspinresonanz-Spektren (NMR-Spektren)	78
4.8	Optimierung des Produktionsprozesses zur Gewinnung der extrazellulären Fructosyltransferase aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	79
4.8.1	Optimierung Medien Schüttelkolbenkultivierung	79
4.8.2	Bioreaktor-Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871.....	80
4.9	Optimierung zur Herstellung und Aufreinigung der rekombinanten Fructosyltransferase.....	82
4.9.1	Expressionsoptimierung durch Anpassung des Codon Adaptation Index.....	82
4.9.2	Expressionstemperatur zur Optimierung der recFTF _{Strep} Ausbeute	82
4.9.3	Bioreaktorkultivierung zur Produktion von recFTF _{Strep}	82
4.9.4	Untersuchungen zum Agglomerationionsverhalten.....	82
4.9.5	Renaturierungsverhalten gelöster recFTF inclusion bodies	82
4.9.6	Zellaufschluss mit Zusatz von DNase / Lysozym.....	83
4.10	Methoden zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter	83
4.10.1	Bestimmung der Enzymaktivität.....	83
4.10.2	Bestimmung der Ausbeute, Umsatz und Selektivität.....	84
4.10.3	Bestimmung des pH-Optimums.....	84
4.10.4	Bestimmung des Temperaturoptimums und der Temperaturstabilität	85
4.10.5	Einfluss von freien Ionen auf die Enzymaktivität der recFTF _{Strep}	85

4.11	Immobilisierung der rekombinanten Fructosyltransferase.....	85
4.11.1	Adsorption an Bentonit	85
4.11.2	Adsorption an Hydroxylapatit	86
4.11.3	Kovalente Anbindung an Eupergit C	86
4.11.4	Einschluss in eine Alginatmatrix	86
4.11.5	Integration der Adsorption bei der FTF-Renaturierung.....	87
4.12	Physikochemische Charakterisierung der Adsorbentien Bentonit und Hydroxylapatit	88
4.12.1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	88
4.12.2	Elementverteilung der Trägermaterialien	89
4.12.3	Elementaranalyse der Trägermaterialien	89
4.12.4	Thermogravimetrische Analyse	89
4.12.5	Größenbestimmung der Oberfläche durch BET-Messung	89
4.12.6	Ermittlung der Partikelgrößenverteilung im Laserbeugungsspektrometer	89
5	Ergebnisse und Diskussion.....	91
5.1	Optimierung der Aktivitätsausbeute der FTF bei Kultivierungen von <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	91
5.1.1	Kultivierungsoptimierung in statischer Schüttelkolbenkultur	91
5.1.1.1	Kultivierungseinfluss pH-Wert	92
5.1.1.2	Kultivierungseinfluss von Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle.....	93
5.1.2	Batchkultivierung in Kleinfermentern (Biostat Q System)	95
5.1.3	Kultivierungseinfluss Sauerstoffzufuhr	97
5.1.4	Auswirkungen der Kultivierungsparameter auf die FTF-Aktivität	97
5.2	Aufreinigung und Isolierung der nativen FTF	98
5.2.1	Aufkonzentrierung nativer FTF mittels Filtration.....	98
5.2.2	Proteinaufreinigung mittels FPLC	99
5.3	Identifizierung der FTF aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	100
5.3.1	N-terminale Proteinsequenzierung.....	100
5.3.2	Identifizierung der Gensequenz für die Fructosyltransferase aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	101
5.3.3	Phylogenetische Abstammung	102
5.4	Rekombinante Fructosyltransferase-Produktion mittels <i>Escherichia coli</i>	104
5.4.1	Klonierung der <i>sacB</i> und <i>ftf</i> Gensequenz mit His-Tag.....	104
5.4.1.1	Restriktionsanalyse	104
5.4.1.2	Expressionsanalyse	105
5.4.2	Klonierung der <i>ftf</i> -Gensequenz mit Strep-Tag.....	106
5.4.2.1	Restriktionsanalyse	107
5.4.2.2	Expressionsanalyse	107
5.4.3	Expressionsoptimierung durch Anpassung des Codon Adaptation Index (CAI) ..	108
5.4.4	Aufreinigung und Isolierung der rekombinanten Fructosyltransferase.....	110
5.4.4.1	Aufreinigung der recFTF _{His} mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie	110
5.4.4.2	Aufreinigung der recFTF _{His} mittels Anionentauscher (Resource Q)	110

5.4.4.3	Aufreinigung der recFTF _{Strep} mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	111
5.4.4.4	Aufreinigung der inclusion bodies der recFTF _{Strep}	112
5.4.5	Aggregation hochkonzentrierter recFTF-Lösungen	116
5.4.6	Expressionsoptimierung durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen	117
5.4.6.1	Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Expression löslicher und unlöslicher recFTF _{Strep}	117
5.4.6.2	Untersuchungen zur Proteinexpression der recFTF _{Strep} bei Bioreaktorkultivierung	119
5.4.6.3	Escherichia coli Zellaufschluss mit Zusatz von DNase / Lysozym	121
5.5	Untersuchungen zur Kinetik und zur Akzeptorspezifität der FTF aus <i>Bacillus subtilis</i> 11871 und den rekombinanten Varianten recFTF_{His} und recFTF_{Strep}	122
5.5.1	Einfluss der Temperatur und des pH auf die Aktivität der recFTF _{His}	122
5.5.2	recFTF-Reaktion mit Saccharose	124
5.5.3	Kinetische Charakterisierung der FTF, recFTF _{His} und recFTF _{Strep}	124
5.5.4	Bilanzierung der recFTF-Reaktion mit Saccharose	128
5.5.5	Einfluss von Glucose auf die Reaktion mit Saccharose	130
5.5.6	Bildung von den Akzeptorprodukten Galactosyl- und Xylosylfructosid	131
5.5.7	Transferase- und Hydrolyseaktivität bei der Substrat- und Akzeptorreaktion	136
5.6	Immobilisierung der rekombinanten Fructosyltransferase	138
5.6.1	Physikochemische Charakterisierung der Adsorbentien Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit	138
5.6.2	Adsorptive Bindung an Bentonit und Hydroxylapatit	143
5.6.3	Kovalente Bindung an Eupergit C	151
5.6.4	Matrixeinschluss in Alginat	152
5.6.5	Einfluss von trägergebundenen Ionen auf die Adsorption und die Enzymaktivität der recFTF	153
5.6.6	Einfluss von freien Ionen auf die Enzymaktivität der recFTF	154
5.6.7	Zusammenfassung unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden	157
5.6.8	Integration der Adsorption bei der FTF-Renaturierung durch Dialyse	159
5.7	Produktion definierter FOS durch die β-Fructofuranosidase Suc1 aus <i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	163
5.7.1	Homologe Expression der Fructofuranosidase Suc1 durch <i>Aspergillus niger</i> AB 1.13	163
5.7.2	Kinetische Charakterisierung der Fructofuranosidase Suc1	164
5.7.3	Bilanzierung der Suc1-Reaktion mit Saccharose	166
5.7.4	FOS-Synthese durch die Fructofuranosidase Suc1	169
5.7.4.1	Bildung von 1-Kestose und 1-Nystose aus Saccharose	169
5.7.4.2	Akzeptorreaktion mit Galactose bzw. Xylose	170
5.7.5	Herstellung von Fructooligosacchariden aus den Saccharoseanaloge	171
6	Zusammenfassung	175
7	Literaturverzeichnis	180

8	Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	212
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	217
9.1	Abbildungsverzeichnis	217
9.2	Tabellenverzeichnis	222
10	Anhang	224

1 Einleitung

Kohlenhydrate haben mit 75 % den größten Anteil an nachwachsender Biomasse ($180 \cdot 10^9$ t/a, Lichtenthaler, 2010). Sie übernehmen als Energieträger, metabolische Zwischenprodukte und als Bausteine komplexer Strukturen lebenswichtige Funktionen im Organismus. Beispielsweise vermitteln Oligosaccharidstrukturen auf der Zelloberfläche essentielle Prozesse wie die Zelldifferenzierung, Zellerkennung, Adhäsion, etc. (Aich und Yarena, 2009). Damit rücken Glycosidstrukturen zunehmend in den Focus der Wissenschaft.

Forschung und Industrie zeigen einen zunehmenden Bedarf an definierten Glycosidstrukturen. Das Einsatzspektrum von Oligosacchariden erstreckt sich breitgefächert von medizinischen Therapeutika und Pharmaprodukten bis hin zu Kosmetik- und Lebensmittelprodukten (Homann und Seibel, 2009; Daude *et al.*, 2012; Osborn *et al.*, 2004). Oligo- und Polyfructoside dienen als funktionelle Lebensmittelzusätze mit präbiotischer Wirkung auf die intestinale Bakterienflora (Roberfroid *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2001). Zudem können Oligofructoside als diätisch wirkende Zuckeraustauschstoffe eingesetzt werden (Costa *et al.*, 2012; Parnell und Reimer, 2009; Capriles und Areas, 2013).

Die chemisch-organische Synthese solcher Oligosaccharide ist aufgrund der enantio- und regioselektiven Verknüpfung gleichwertiger Hydroxylgruppen ein aufwendiger Prozess. Die mehrstufigen Reaktionen erfordern die Vorsynthese schutzgruppenaktivierter Zucker sowie den Einsatz organischer Lösemittel und erzielen nur geringe Ausbeuten.

Als Alternative bietet die Enzymkatalyse die Möglichkeit in wässrigem Medium bei stereo- und regioselektiver Umsetzung deutlich höhere Ausbeuten zu gewinnen. Der klassische Einsatz von Leloir-Transferasen erfordert allerdings teure nukleotidaktivierte Monosaccharide und beschränkt das Donor- und Akzeptorspektrum durch eine hohe Regio- und Stereoselektivität (Seibel, *et al.*, 2006 a). Im Gegensatz dazu nutzen die in der Arbeit verwendeten Nicht-Leloir-Transferasen lediglich die Bindungsenergie des Substrates zur Glycosylierung. Diese Eigenschaften können in enzymtechnologischen Anwendungen industriell nutzbar gemacht werden und beinhalten ein hohes wirtschaftliches Potential.

Die biotechnologische Nutzung von natürlichen oder genetisch modifizierten Biokatalysatoren findet zunehmend ein breiteres industrielles Anwendungsspektrum. Diese biobasierten Verfahren ersetzen zum Teil klassisch chemische Prozesse und vereinfachen den Herstellungs- und Aufarbeitungsprozess durch effiziente Stoffumwandlungen. Dies beinhaltet zumeist auch eine kosten-, ressourcenschonende und emissionsreduzierte Produktion im Sinne der geförderten Bioökonomie (Gavrilescu und Chisti, 2005; BMBF, 2014).

Der Markt für Lebensmittelzusätze, Polymere, Spezial- und Feinchemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen zeigt ein hohes weltwirtschaftliches Wachstum (Schmid *et al.*, 2002; USITC, 2008) und soll laut OECD (2011) die Marktanteile bis 2025 verdoppeln. Das Weltmarktvolumen für Functional Food Produkte betrug im Jahr 2008 40 Mrd. Euro (Koch, 2010). Allein auf die EU entfiel für das Jahr 2006 ein Gesamtmarktvolumen von etwa 12 Mrd. Euro (Siró *et al.*, 2008).

Saccharose dient den eingesetzten Fructosyltransferasen als Substrat für die gezielte Synthese von Saccharidstrukturen. Als nachwachsender, kostengünstiger Rohstoff ist Saccharose besonders für industrielle Synthesen interessant (Lichtenthaler, 2010), da das Substrat in sehr hohen Reinheiten im industriellen Maßstab zur Verfügung steht (Weltproduktion 2013 - 2014: 174,8 Mio t/a (USDA, 2013)). Die Umwandlung von Saccharose zu industriell nutzbaren Fructooligosacchariden beinhaltet zudem eine hohe Wertschöpfung.

Die verwendete Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 weist ein breites Akzeptorspektrum auf und ermöglicht eine Vielzahl von Produkten (Seibel *et al.*, 2005; Seibel *et al.*, 2006 b). Die aus den Akzeptorreaktionen synthetisierten Saccharosederivate können als Substrat für die Fructosyltransferasen bzw. die β -Fructofuranosidasen eingesetzt werden. Damit ist eine zielgerichtete Produktion von Oligofructosiden des Levan- bzw. Inulintyps möglich (Beine *et al.*, 2008; Zuccaro *et al.*, 2008).

Die Enzymimmobilisierung an eine feste Bindungs- oder Einschlussmatrix bietet eine anwendungsorientierte Methode für den technischen Einsatz bei der Produktion von Di- und Oligofructosiden. Die Immobilisierung schränkt die Beweglichkeit der Biokatalysatoren ein und gewährleistet eine hohe Stabilität hinsichtlich der Lagerung und Prozessführung, eine leichte Handhabung, ein gutes Rückhaltevermögen sowie die Möglichkeit zur Wiederverwendung (Buchholz und Kasche, 1997; Cao, 2005; Abdelmajeed *et al.*, 2012).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Eigenschaften und Funktion von Oligo- und Polysacchariden

Die biochemischen Eigenschaften von Kohlenhydraten haben nicht nur Relevanz als reine Energieträger und metabolische Zwischenprodukte, sondern sie übernehmen als Bausteine komplexer Strukturen bedeutende Funktionen bei lebenswichtigen Prozessen im Organismus.

Ausschlaggebend für die physiologische Bedeutsamkeit sind die hydrophilen Eigenschaften und damit die Löslichkeit in wässrigen Systemen sowie die Vielseitigkeit der möglichen Strukturen mit polyfunktionellen Reaktionsmöglichkeiten für spezifische Enzymreaktionen.

Die hohe Funktionalität ergibt sich neben den glycosidischen Verknüpfungsmöglichkeiten der monomeren Einheiten $(\text{CH}_2\text{O})_n$ untereinander auch aus der Verknüpfung zu heterogenen Molekülen mit Protein- oder Lipidbestandteilen, den sogenannten Glycokonjugaten. In Bezug auf die Molekülgröße beinhalten Kohlenhydrate einen sehr hohen Gehalt an funktionellen Gruppen. Durch die chiralen Konformationen der anomeren C-Atome ist schon bei kurzkettigen Sacchariden eine hohe Variation an Stereo- und Konstitutionsisomeren möglich. Diese Vielfältigkeit der Verknüpfungen ermöglicht die dreidimensionale Verzweigung zu äußerst komplexen Strukturen.

Bei Oligo- und Polysacchariden handelt es sich um Kondensate, bei denen die Zuckermomere über o-glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Bei den Kohlenhydrateinheiten handelt es sich um ringförmig geschlossene Hydroxyaldehyde (Glucan) bzw. Hydroxyketone (Fructan).

Polysaccharide können sowohl unverzweigte, lineare als auch verzweigte, nicht-lineare Strukturen beinhalten. Bakterielle Polyfructoside enthalten in Abhängigkeit vom Wirtsorganismus und den Umgebungsbedingungen einen unterschiedlichen Anteil an Verzweigungen (van Hijum *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2009).

Oligosaccharide sind kurzkettige lineare oder verzweigte Zuckerstrukturen und bestehen aus 3 bis 10 Monosacchariden.

Mikrobielle Polysaccharide werden durch Glycosyltransferasen aufgebaut. Diese extrazellulären Polysaccharide (Exopolysaccharide, EPS) können sich homogen aus einem monomeren Baustein oder heterogen aus verschiedenen Bausteinen zusammensetzen, was auch hinsichtlich des Verzweigungsgrades vom Zusammenwirken und Art der exprimierten Glycosyltransferasen abhängt (De Vuyst und Degeest, 1999). Eine Vielzahl von Algen, Hefen, Pilzen und Bakterien, insbesondere Bacillus-, Lactobacillus-, Streptokokken-, und

Leuconostoc-Stämmen produzieren EPS. Die Modifikation von Kohlenhydraten bzw. die Synthese von polymeren Strukturen findet in der näheren Umgebung des exprimierenden Wirts statt, um dem Mikroorganismus optimale Wachstumsbedingungen zu verschaffen:

- Schutz vor Austrocknung, Antibiotika, Toxinen und Phagozytose
- Wirtsspezifisches Nährstoffreservoir
- Adhäsion an Oberflächen und Biofilmbildung
- Pathogenitätsfaktor

In Form von Glykokonjugaten bilden zellassoziierte Oligosaccharide eine spezifische Oberfläche bei eukaryotischen Zellen, welche als Glycokalyx bezeichnet wird und wichtige biologische Funktionen vermittelt (Abb. 2.1.1). Man schätzt, dass mehr als die Hälfte aller Proteine glycosyliert wird (Apweiler *et al.*, 1999). Etwa 1 % der genetischen Informationen aus den offenen Leserahmen eines jeden Genoms dient dem Aufbau von Zuckerbindungen (Coutinho *et al.*, 2003).

Die Oberflächen von Mikroorganismen, Viren und tierischen Zellen präsentieren in der Glycokalyx Oligosaccharidstrukturen, die für die Mediation der biologischen Prozesse wichtige Funktionen erfüllen. Der Infektionsweg vieler pathogener Virus- und Bakterienerkrankungen beinhaltet spezifische kohlenhydratbasierte Erkennungsmechanismen, ebenso wie Entzündungsreaktionen, Autoimmunkrankheiten und Krebszellentwicklung.

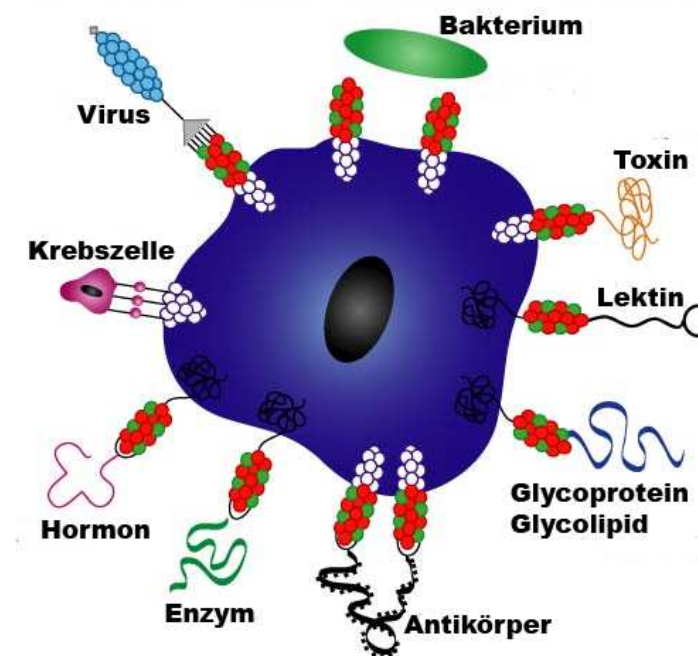


Abb. 2.1.1: molekulare Zellerkennung membranassoziierter Kohlenhydrate nach Wong (2012).

Kohlenhydrate spielen damit in unserem Leben eine übergeordnete Rolle, die weit über die Funktion zur Energiegewinnung und als Strukturmaterial hinausgeht (Tab. 2.1.1).

Tab. 2.1.1: Funktionen von Glycanstrukturen in Glycoproteinen nach Lis (1993).

Eigenschaft	Funktion
physikochemisch	Veränderung der Löslichkeit, der elektrischen Ladung, der Masse, der Größe und Viskosität in Lösung, Kontrolle bei der Proteinfaltung, Stabilisierung der Proteinkonformation, Beeinflussung der thermischen Stabilität und Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau
biologisch	Regulierung der intrazellulären Stoffflüsse und der Lokalisation von Glycoproteinen, bestimmt den Lebenszyklus von Glycoproteinen im Stoffkreislauf, Veränderung immunogener Eigenschaften, Veränderung der Aktivität von Enzymen und Hormonen, fungiert als Zelloberflächenrezeptor für Lectine, Antikörper und Toxine, Beteiligung bei Zell-Zell-Interaktionen

2.2 Anwendungsmöglichkeiten von Fructooligosacchariden und Fructanen

Kohlenhydrate sind durch ein breit gefächertes Einsatzspektrum bei der Lebensmittelproduktion, in der Medizin und als chemischer Grundstoff sowohl unter wissenschaftlichen als auch kommerziellen Aspekten eine äußerst interessante Stoffklasse. Der bisher geringe Nutzungsgrad von nur 4 % aller Kohlenhydrate aus nachwachsender Biomasse (Lichtenthaler, 2010) verspricht zudem ein hohes Wertschöpfungspotential auf Basis kostengünstiger Rohstoffe.

Fructooligosaccharide kommen als natürliche Speicherstoffe in einer Vielzahl von Pflanzen (Artischocken, Knoblauch, Chicorée Zwiebeln, etc.) und pflanzlichen Bestandteilen der Nahrung wie Weizen und Roggen vor.

Die Herstellung eines breiten Spektrums an definierten Fructooligosacchariden (FOS) eröffnet eine Fülle an Einsatzmöglichkeiten. Aufgrund der exponentiell steigenden Variationsmöglichkeiten bei der Verknüpfung gleicher oder unterschiedlicher Zuckermomere zu Saccharidoligomeren spielt die enantio- und regioselektive Verknüpfung aufgrund der Vielzahl an chiralen Zentren im Zuckergrundgerüst eine wesentliche Rolle.

Die biochemischen Eigenschaften und daraus resultierenden physiologischen Effekte von Oligosacchariden sind in Tab. 2.2.1 aufgeführt.

Tab. 2.2.1: Eigenschaften von Oligosacchariden nach Nakakuki (2002).

Eigenschaft	Funktion
physikochemisch	Süße, Bitterkeit, hygroskopisch, hohe Wechselwirkung mit Wasser, Verdickungsmittel für Getränke, Stabilisator für aktive Substanzen (Proteine, Geschmacksstoffe, Farben, etc.), hohes Aufnahmevermögen
biologisch	Verdaulichkeit, nicht kariogen, bakterienhemmend, selektive Verwertung für Bifidobakterien, Verbesserung von Impfstoffverträglichkeit, Blutzuckerverringerung
andere	Spezifisches Enzymsubstrat, Enzyminhibitor, Induktor, etc.

2.2.1 Fructooligosaccharide in der Lebensmittelherstellung

Fructooligosaccharide können als Zuckeraustauschstoffe eingesetzt werden. Diese wirken zumeist antikariogen, können also von der Bakterienflora im Mundraum nicht verwertet werden. Seit ca. 1980 werden sie in der Lebensmittelindustrie im Bereich Getränke und Süßigkeiten verwendet (Krahl, 2010). Neue Anwendungsbereiche finden sich zunehmend im Nahrungsmittelsektor bei der Herstellung von Additiven mit präbiotischer Wirksamkeit.

Die FOS werden im Vergleich zu leicht verfügbaren Zuckern, wie Glucose und Saccharose, deutlich langsamer verstoffwechselt, so dass die Energiebereitstellung über einen längeren Zeitraum erfolgt und der Blutzuckerspiegel nur gering ansteigt (Costa *et al.*, 2012; Yamashita *et al.*, 1984). Durch FOS können über die Glucoseregulation positive Effekte bei der Gewichtsreduktion infolge einer veränderten Ausschüttung von Sättigungshormonen erzielt werden (Parnell und Reimer, 2009). Ein Austausch herkömmlicher Zutaten mit 12 % inulinartigen Fructanen führt bei glutenfreiem Brot zu einer Absenkung des Glykämischen Index um 32 % (Capriles und Areas, 2013). Im Vergleich zur Saccharose (100 %) weisen FOS eine Süßkraft von 30 - 50 % und gleichzeitig eine hohe Löslichkeit auf (Kaur und Gupta, 2002), was die FOS für den Einsatz als diätische, funktionelle Austauschstoffe besonders interessant macht.

Bakteriell hergestellte Polysaccharide werden in der Lebensmittelindustrie als sogenannte Bulkstoffe eingesetzt. Sie finden Einsatz in der Nahrungsmittelproduktion als Emulgatoren, Stabilisatoren oder als Geliermittel. Durch Zugabe von FOS können die rheologischen Eigenschaften zu einer höheren Viskosität bzw. die Textur verändert werden, was vielen Lebensmitteln eine geschmeidige fettähnliche Wahrnehmung verleiht.

2.2.1.1 Einsatz von Fructooligosacchariden als Präbiotika

Weitere ernährungsphysiologische Effekte ergeben sich aus dem Einsatz von FOS-Präbiotika als Lebensmittelzusatz in funktionellen Lebensmitteln („Functional Food“). Dabei handelt es sich um nicht verdauliche bzw. nur teilweise fermentierbare Lebensmittelbestandteile, die durch selektive Stimulation das Wachstum und/oder die Aktivität der probiotisch aktiven Bakteriendarmflora anregen und damit die Gesundheit und das Wohlbefinden des Wirts verbessern (Gibson und Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007). Kurzkettige Inulooligosaccharide, wie Glu-Fru₂, Glu-Fru₃, Fru₃ und Fru₄, bewirken positive Effekte auf die intestinale Bakterienflora (Nakamura *et al.*, 2001).

Während leicht verdaubare Kohlenhydrate bereits im sauren Milieu des Magens hydrolysieren oder dort bzw. im Dünndarm enzymatisch gespalten werden, können FOS-Präbiotika aufgrund ihrer Unverdaulichkeit in den Dickdarm gelangen. Dort werden sie durch Bifidobakterien und Lactobazillen zu kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat und Lactat umgesetzt. Zum einen können die Stoffwechselprodukte nun vom Wirt verwertet werden, und zum anderen führt dies zu einer Absenkung des intraluminaren pH. Dadurch werden pathogene, nicht säurebildende Mikroorganismen am Wachstum gehemmt und der bifidogenen Population wird ein weiterer Wachstumsvorteil verschafft. Viele weltweite Studien haben die positive Wirkung auf die Zusammensetzung der menschlichen Intestinalmikroflora bereits bewiesen (Cummings *et al.*, 2001). In Tab. 2.2.2 ist exemplarisch die kontrollierte Glycosidaufnahme während einer 45-tägigen Diät (je 15 Tage Saccharose, Oligofructose bzw. Inulin) darstellt (nach Gibson *et al.*, 1995).

Tab. 2.2.2: Auswirkung auf die prozentuale Zusammensetzung der menschlichen mikrobiellen Intestinalmikroflora durch die Aufnahme von 15 g/Tag an Saccharose, Oligofructose bzw. Inulin. Aus Kaur und Gupta (2002) nach einer klinischen Studie von Gibson *et al.* (1995)

Mikroflora	Zugabe an Nährstoff		
	Saccharose	Oligofructose	Inulin
Bakteroides	72	16	26
Bifidobakterien	17	82	71
Clostridien	2	1	0,3
Fusobakterien	9	1	3

Präventive Eigenschaften für die Gesundheit resultieren durch die Verringerung des Risikos für Faktoren des metabolischen Syndroms (Fettleibigkeit, unzuträgliche Blutfettwerte, Bluthochdruck, *Diabetes mellitus* Typ2), für Osteoporose, arteriosklerotische Gefäßerkrankungen, für Darmkrebs sowie eine Senkung des Cholesterinspiegels und Erhöhung der Mineralsorption (Ca, Mg, Fe, Zn) (Kelly, 2009; Coudray *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2004; Roberfroid und Delzenne, 1998; Roberfroid *et al.*, 2010). Durch FOS-bedingte Modulation des Immunsystems kann ein positiver Effekt bei gastrointestinalen Infektionskrankheiten nachgewiesen werden (Dominguez-Vergara *et al.*, 2009; Rastall, 2010).

2.2.1.2 Marktpotential von FOS-Präbiotika in funktionellen Lebensmitteln

Die größten Umsatzmärkte für FOS-Präbiotika setzen sich aus USA, Japan und der EU zusammen, wobei der "Functional Food"-Absatz nicht nur in Europa, sondern weltweit signifikant steigt (Abb. 2.2.1). Frankreich, Deutschland, Großbritannien und die Niederlande repräsentieren die wichtigsten Märkte in der EU (Siró *et al.*, 2008; Annunziata und Vecchio, 2011). In der Europäischen Union werden diese Lebensmittel als „Wellness-“ bzw. „Funktionelles Produkt“ angeboten.

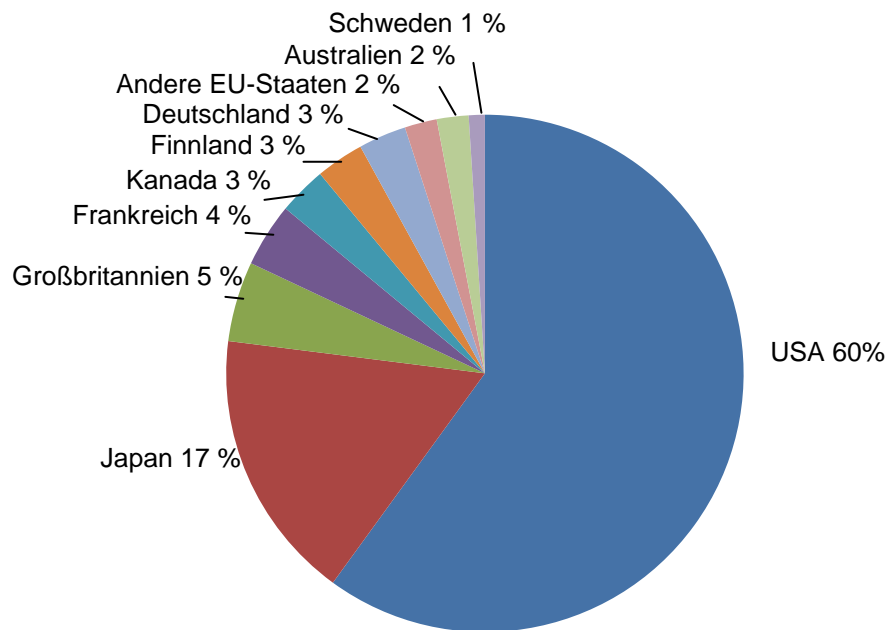


Abb. 2.2.1: Weltweiter Absatzmarkt für Functional Food (abs. 38,8 Mrd., nach Dustmann (2004)).

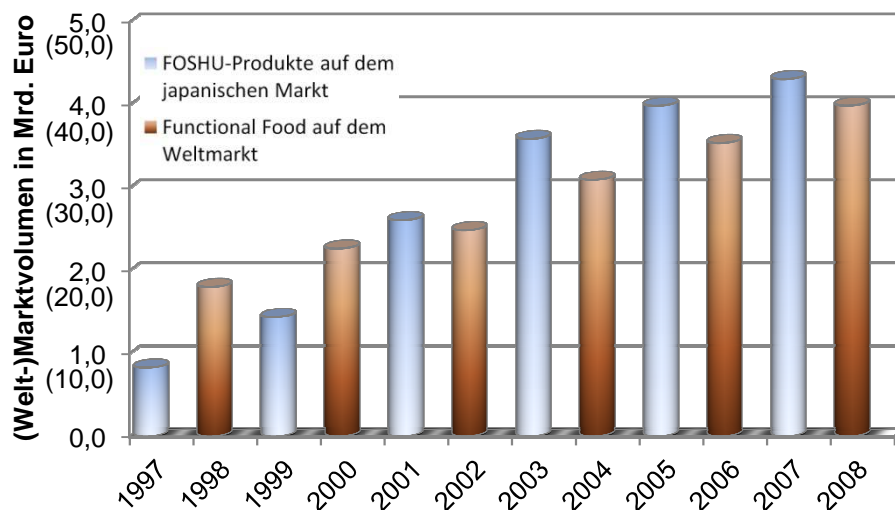


Abb. 2.2.2: Entwicklung des Marktvolumens von FOS-Produkten in Japan von 1997 bis 2007 (nach Daten der Japan Health Food & Nutrition Association, 2008) und Entwicklung des Weltmarktvolumens (in Klammern) nach Daten der MAPP Conference 2008 (Koch, 2010)

Der Absatz an FOS-Produkten hat sich in 10 Jahren (1997 - 2007) mehr als verfünffacht und auch der globale Umsatz umfasst durchschnittlich jährliche Wachstumsraten von 8,8 % (Abb. 2.2.2). Nach Siró *et al.* (2008) entfallen auf die EU für das Jahr 2006 ein Gesamt-Marktvolumen von etwa 12 Mrd. Euro. Functional Food besitzt in der EU und auch insbesondere in den bisher schwachen osteuropäischen Absatzmärkten ein hohes Wachstumspotential.

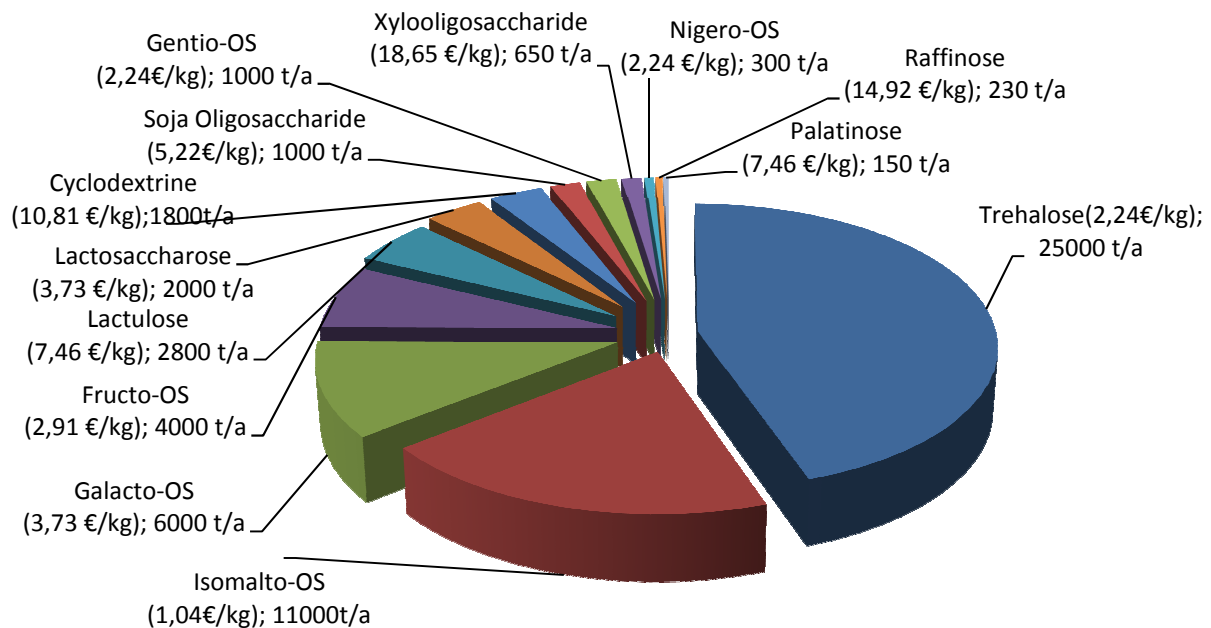


Abb. 2.2.3: Oligosaccharidproduktion in Japan 2003 (nach Taniguchi, 2004).

Im Jahr 2003 enthielten 30 % der neu zugelassenen FOSHU-Produkte Oligosaccharide als funktionellen Bestandteil (Taniguchi, 2004). Über 80 % der gesamten japanischen Oligosaccharidproduktion bestanden zu dem Zeitpunkt aus dem $\alpha(1\rightarrow1)$ verknüpften Disaccharid Trehalose (44,6 %) sowie den Isomalto- (19,7 %), Galacto- (10,7 %) und Fructooligosacchariden (7,2 %) (Abb. 2.2.3). Damit nehmen FOS durch den steigenden Bedarf einen wichtigen Stellenwert für die industrielle Produktion ein. Der Einsatz von kostengünstigen Rohstoffen, wie Saccharose (0,26 €/kg, Stand 08.2014), beinhaltet durch die biochemische Umwandlung zu industriell nutzbaren Fructooligosacchariden eine hohe Wertschöpfung. Saccharose steht als nachwachsender Rohstoff in reiner, kristalliner Form in großen Mengen als kostengünstiges energiereiches Substrat zur Verfügung (Weltproduktion 2013 - 2014: 174,8 Mio t/a (USDA, 2013)).

2.2.2 Einsatz in der Pharmazie

Bei der Diagnostik von Stoffwechselerkrankungen, viralen und bakteriellen Erkrankungen sowie Krebs werden Oligosaccharide als spezifische Marker genutzt (Hoffmann, 2004). Auch bei der Entwicklung von Impfstoffen bzw. Adjuvantien sowie antiviralen, bakteriellen,

toxigenen, oxidativen und tumorigenen Therapeutika zeigen Oligosaccharide selektive Wirkung (Aich und Yarena, 2009; Osborn *et al.*, 2004; Abdel-Fattah *et al.*, 2012; Ghazarian *et al.*, 2011; Peri, 2012; Lepenies *et al.*, 2010).

Für FOS werden des Weiteren immunoregulatorische Veränderungen der IgA-Antikörper, Cytokine sowie Lymphozyten beobachtet, die das Potential zur Verbesserung der allgemeinen Immunantwort und zur Linderung von atopischen Ekzemen und allergenen Erscheinungen beinhalten (Tang, 2009). Bei der Co-Kultivierung von 1-Nystose, Man-Fru₃ und Fuc-Fru₃ zeigen humane Caco-2-Zellen eine deutliche Stimulation bei der Ausschüttung der Cytokine CCL2 (MCP-1) sowie CXCL8 (IL-8) bei Fuc-Fru₃ (Homann *et al.*, 2012).

2.3 Chemische Synthese von Oligosacchariden

Die komplexe Struktur von Mehrfachzuckern erschwert die chemisch-organische Synthese durch die vielen reaktiv gleichwertigen Hydroxylgruppen sowie die regio- und stereoselektive Ausrichtung der glycosidischen Bindungen. Die schutzgruppenspezifische Aufbereitung der Edukte und Zwischenprodukte führt zu geringen Ausbeuten, welche zudem durch die Entsorgung der eingesetzten organischen Lösemittel sowie der gesundheitsgefährdenden Stoffe die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens beschränkt. Seeberger und Werz (2007) entwickelten eine automatisierte Methode um mittels einer spacervermittelten Festphasenimmobilisierung des Akzeptors die chemische Synthese von Kohlenhydratstrukturen zu vereinfachen.

2.4 Enzymatische Synthese von Oligosacchariden

Die Klassifizierung von Glycosyltransferasen (GTs) erfolgt hinsichtlich der spezifischen Glycosylierungsreaktion, wobei im Allgemeinen Monosaccharideinheiten eines aktivierten Zuckers unter Ausbildung einer glycosidischen Bindung auf ein spezifisches Akzeptormolekül transferiert werden (CAZY, Definition, 2014). Im numerischen "Enzyme Commission System" werden die Glycosyltransferasen (GTs, EC 2.4.x.y) und Glycosidhydrolasen (GHs, EC 2.4.x.y, EC 3.2.1.z) einer strukturell und funktionell verwandten Klasse zugeordnet. Eine weitere Unterteilung erfolgt hinsichtlich der dreidimensionalen Anordnung der Strukturelemente des Proteins in Clans (GT-A bis GT-B und GH-A bis GH-N). Bei den resultierenden Produkten wird zudem zwischen einem beibehaltendem (α -Glycosid) und einem inversen (β -Glycosid) Mechanismus unterschieden (Lairson *et al.*, 2008).

In Abhängigkeit von der Übertragung des Glucose- bzw. Fructoserestes unterscheidet man:

- Glucosyltransferasen (GTFs)
- Fructosyltransferasen (FTFs)

2.4.1 Enzymatische Glycosylierung durch Leloir- und Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen lassen sich aufgrund der Substratspezifität in Leloir- und Nicht-Leloir-Transferasen unterteilen (Abb. 2.4.1).

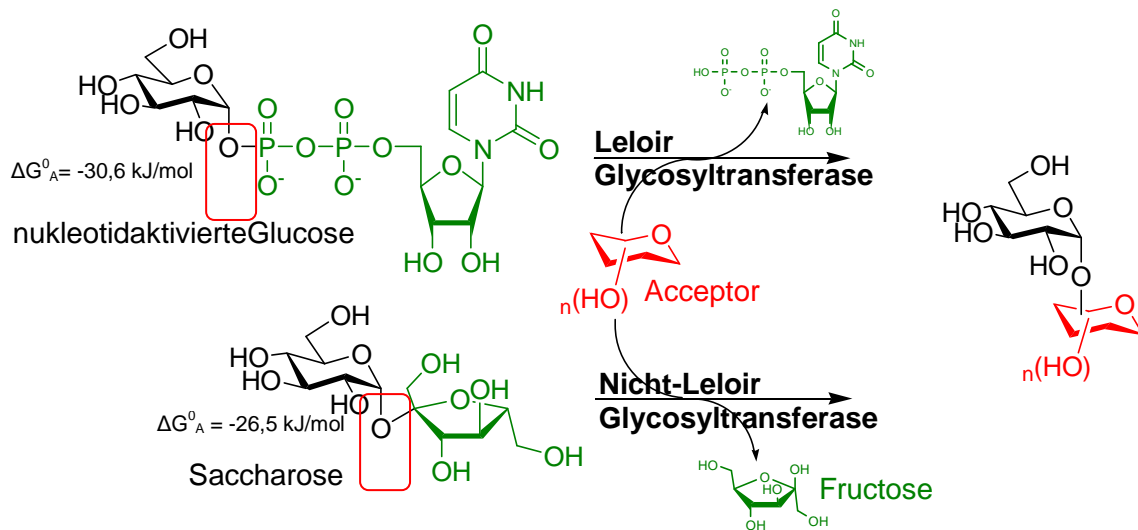


Abb. 2.4.1: Reaktionsweg von Leloir- und Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen zur Bildung des glycosylierten Akzeptormoleküls mittels nukleotidaktivierter Glucose (UDP-Glucose) bzw. Saccharose als Substrat (ΔG^0_A aus Seibel *et al.*, 2006 a).

Leloir-Transferasen nutzen nukleotidaktivierte Monosaccharide (UDP-X) zur Übertragung des Glycosylbausteines auf einen Akzeptor (Caputto *et al.*, 1950; Leloir, 1971). Für die metabolische Biosynthese von Oligosaccharid- und Glycokonjugatstrukturen dienen vorwiegend Glu, GluNAc, Gal, GalNAc, Man, Fuc als Transferglycosylreste. Die hohe Bindungsenergie der Substrate ermöglicht *in vivo* eine Fülle von möglichen Transglycosylierungsreaktionen. Diese Enzyme sind bei tierischen/pflanzlichen Zellen sowie vielen Mikroorganismen maßgeblich an der co- und posttranslationalen Glycosylierung der Glycokalix beteiligt. Die Substrate, welche sich durch aufwendige Nukleotid-Transferase/Pyrophosphorylase Enzymreaktionen herstellen lassen, sind äußerst teuer und stehen nur in begrenzten Mengen kommerziell zur Verfügung. Leloir-Glycosyltransferasen zeichnen sich durch eine hohe Regio- und Stereoselektivität aus (Seibel *et al.*, 2006 a), welche den Zugang zu einem erweiterten Donor- und Akzeptorspektrum stark beschränkt.

Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen nutzen die Bindungsenergie der glycosidischen Bindung von Saccharose. Zudem kann der Glycosylrest der Saccharose auch auf Akzeptoren, wie beispielsweise Monosaccharide, zur Synthese von Saccharoseanalogia übertragen werden (Kapitel 2.4.4).

2.4.2 Fructosyltransferasen

Bakterielle Fructosyltransferasen bzw. -sucrasen katalysieren die Übertragung von Fructosylresten ausgehend vom Substrat Saccharose auf sukzessiv wachsende β -D-Fructofuranose (Fructan). Bakteriell Fructan besteht oftmals aus hochmolekularen, teils verzweigten Polymerstrukturen von mehr als 2×10^4 bis 50×10^6 kDa (van Hijum *et al.*, 2006). Fructosyltransferasen werden in Bezug auf die glycosidische Verknüpfung zwischen den Fructosyleinheiten des Polymers in Levansucrasen und Inulosucrasen unterteilt:

- **Levan** (α Glu(1-2) β Fru [(2-6) β Fru]_n):

Ein lineares Homopolymer von Saccharose ausgehend mit β -(2→6)-verknüpften Fructosyleinheiten, welches 5 - 30 % β -(2→1)-Verknüpfungen beinhalten kann (Han, 1990; Moraru, 2006, Dogsa *et al.*, 2013). Erstes FOS-Intermediat der Levanbiosynthese (Abb. 2.4.2, A) ist 6-Kestose.

- **Inulin** (α Glu(1-2) β Fru [(2-1) β Fru]_n):

Die β -(2→1)-verknüpften Fructosemonomere dieses Homopolymers sind linear angeordnet und können vereinzelt 5 - 10 % β -(2→1→6)-Verknüpfungen enthalten (van Hijum *et al.*, 2006). Kürzeste FOS-Struktur bei der Inulinbiosynthese (Abb. 2.4.2, B) bildet die 1-Kestose.

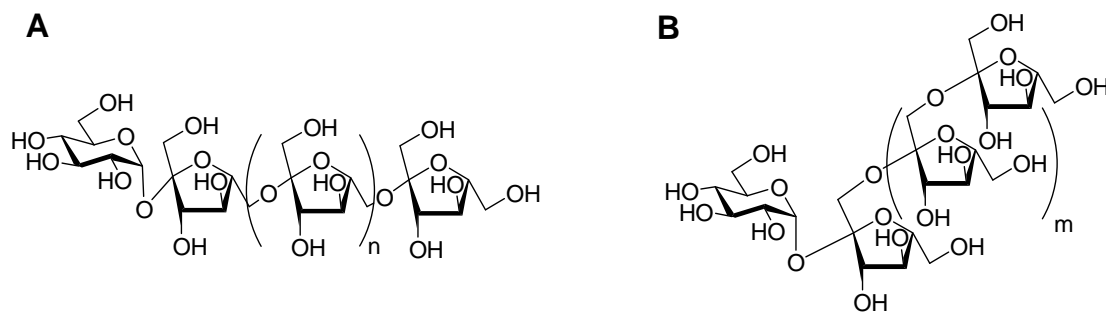


Abb. 2.4.2: A: Struktur Levan β -(2→6) glycosidisch [n=0: 6-Kestose, n=1: 6-Nystose];

B: Struktur Inulin β -(2→1) glycosidisch [n=0: 1-Kestose, n=1: 1-Nystose].

Levansucrasen (EC 2.4.1.10) und Inulosucrasen (EC 2.4.1.9) werden der Glycosidhydrolase Familie GH 68 zugeordnet, welche außerdem die β -Fructofuranosidasen (EC 3.2.1.26, Kapitel 2.4.3) beinhaltet und mittlerweile fast 200 Fructosyltransferasen ausschließlich bakteriellen Ursprungs umfasst. Die Enzyme dieser Familie korrelieren nur teilweise durch einige konservierte AS-Sequenzbereiche. Daher werden sie aufgrund der Anordnung ihrer räumlichen Strukturelemente sowie des Reaktionsmechanismus klassifiziert. In Tab. 2.4.1 sind kinetisch charakterisierte FTFs der Familie GH 68 aufgelistet.

Tab. 2.4.1: Bakterielle Fructosyltransferasen der Strukturfamilie GH 68 und deren kinetische Parameter für das natürliche Substrat Saccharose.

FTF und Stamm	M _r [kDa]	T _{opt} [°C]	t _{1/2} [*] [min (°C)]	pH _{opt} [-]	K _{MSac} [mM]	Referenz
Levansucrasen (EC 2.4.1.10)						
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	52,0	25,0	9 (50)	6,0 - 6,2	19,0	Mäntsälä und Puntala, 1982
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49,0	30,0	n.d.	6,0	47,8	Rairakhwada <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus circulans</i>	n.d.	35,0	103,4 (60)	5,2	14,3	El-Refai <i>et al.</i> , 2009 a, 2009 b
<i>Bacillus licheniformis</i>	45,0	50,0	60 (90)	6,5	n.d.	Belghith <i>et al.</i> , 2012; Dahech <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus megaterium</i>	52,0	45,0	>24h (37)	6,0	6,6	Homann <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus subtilis</i>						
n.d.	n.d.	n.d.	52 (40)	6,0	8,0	Ortiz-Soto <i>et al.</i> , 2008
NRC33a	n.d.	30,0	80,6 (60)	5,2	n.d.	Esawy <i>et al.</i> , 2008
C4	n.d.	37,0	n.d.	5,5 - 7,0	13,5	Euzenat <i>et al.</i> , 1997
QB127	52,0	25,0	4 (50)	5,6 - 6,0	14,0	Mäntsälä und Puntala, 1982
BB04	52,0	50,0	n.d.	6,0	16,8	Vaidya und Prasad, 2012
<i>Erwinia herbicola</i>	48,0	n.d.	30 (52)	6,0	28,0	Cote und Imam, 1989
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	54,4	57,0	>6h (47)	6,0 - 6,5	270	Inthanavong <i>et al.</i> , 2013
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> SRT4	58,0	30,0	k.A.(≥ 60)	5,0	11,4	Batista <i>et al.</i> , 1999; Hernandez <i>et al.</i> , 1995
<i>Lactobacillus gasseri</i>	84,0	50,0	k.A.(≥ 60)	3,5 - 4,5	6,7	Anwar <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactobacillus panis</i>	87,8	45,0	n.d.	4,0	22,5	Waldherr <i>et al.</i> , 2008
<i>Lactobacillus reuteri</i>	63,8	50,0	n.d.	4,5	21,0	van Hijum <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	73,0	35,0	n.d.	5,4	13,1	Tieking <i>et al.</i> , 2005
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	90,0	30,0	120 (35)	6,0	36,7	Morales-Arrieta <i>et al.</i> , 2006
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	47,1	30,0	k.A.(≥50)	6,2	26,6	Kang <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas syringae</i>	45,0	60,0	n.d.	5,8 - 6,6	160	Hettwer <i>et al.</i> , 1995
<i>Rahnella aquatilis</i>	120,0	60,0	k.A.(≥70)	6,0	50,0	Ohtsuka <i>et al.</i> , 1992
<i>Streptococcus salivarius</i>	125,4	37,0	n.d.	6,0	5,0	Song und Jacques, 1999 a
<i>Zymomonas mobilis</i>	46,7	n.d.	n.d.	6,0	40,0	Goldman <i>et al.</i> , 2008
<i>Zymomonas mobilis</i>	56,0	50,0	n.d.	5,0	125,0	Yanase <i>et al.</i> , 1992, 2002

FTF und Stamm	M _r [kDa]	T _{opt} [°C]	t _{1/2} [*] [min (°C)]	pH _{opt} [-]	K _{MSac} [mM]	Referenz
Inulosucrasen (EC 2.4.1.9)						
<i>Lactobacillus reuteri</i>	85,0	50,0	n.d.	5,0	n.d.	van Hijum <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	87,2	55,0	n.d.	4,5 - 6,0	n.d.	Anwar <i>et al.</i> , 2008
<i>Leuconostoc citreum</i>	165,0	45,0	70 (40)	6,5	66,0	Olivares-Illana <i>et al.</i> , 2002, 2003
<i>Lactobacillus gasseri</i>	83,0	50,0	k.A.(≥ 60)	4,5 - 5,5	n.d.	Anwar <i>et al.</i> , 2010

n.d. (nicht detektiert); * t_{1/2}: k.A. (keine Aktivität); T_{opt} / pH_{opt} (optimale Temperatur / pH)

2.4.2.1 Reaktionen von Levansucrasen

Levansucrasen katalysieren den Transfer des Fructosylrestes aus dem Substrat Saccharose auf ein Akzeptormolekül, dabei können drei Reaktionen unterschieden werden (Abb. 2.4.3).

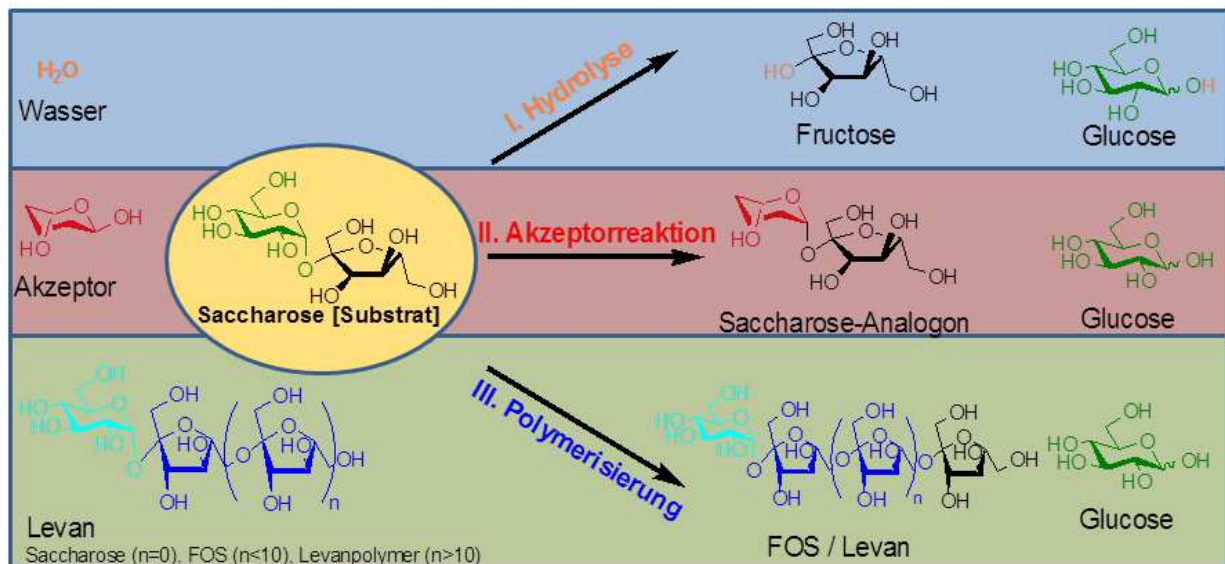


Abb. 2.4.3: Reaktionen der Levansucrase.

Durch die Bindung von Saccharose am Enzym bildet sich der Enzym-Fructosyl-Komplex als Zwischenprodukt aus, was die Spaltung der glycosidischen Bindung und die Freisetzung von Glucose bewirkt. Die dabei freiwerdende Energie wird zur Übertragung des Fructosylrestes auf ein Akzeptormolekül genutzt. Wasser oder ein weiteres Saccharose- bzw. Fructanmolekül dient als Akzeptormolekül, so dass entweder Fructose durch Hydrolyse oder eine sukzessiv wachsende Fructankette durch Polymerisierung aus der Reaktion hervorgeht (Chambert *et al.*, 1974). Bei stark polymerisierenden FTFs kann der Anteil der endständigen Glucose im Fructan vernachlässigt werden (Han, 1990). Die Fructosylierung des Polymers verläuft zufällig und unabhängig vom Polymerisierungsgrad (Chambert *et al.*, 1974). Die Bildung von Produkten und deren Folgeprodukte durchläuft in Richtung Polymerbildung Konzentrationsmaxima (Seibel *et al.*, 2006 b).

In Gegenwart weiterer Moleküle (z.B. Monosaccharide) kann alternativ auch eine Hydroxylgruppe dieses sog. Akzeptors fructosyliert werden. Das eingesetzte

Konzentrationsverhältnis von Fructosyldonor und -akzeptor hat durch die enzymbedingte Toleranz von Substrat- bzw. Akzeptorspezifität einen entscheidenden Einfluss auf die Produktausbeute. Welche der parallel möglichen Reaktionen überwiegt, wird durch die morphologischen und biochemischen Eigenschaften der Levansucrase sowie die Reaktionsbedingungen bestimmt. Physikochemische Parameter wie pH-Wert, Temperatur sowie Puffermolarität wirken sich auf die räumliche Konformation des Enzyms und damit die Gewichtung von Hydrolyse- oder Polymerisierungsreaktion aus.

2.4.2.2 Struktur und Reaktionsmechanismus von Levansucrasen

Die in dieser Arbeit verwendete Levansucrase (EC 2.4.1.10) aus *Bacillus subtilis* sowie die β -Fructofuranosidase (EC 3.2.1.26, GH32) aus *Aspergillus niger* werden beide dem strukturkonservierten Motiv eines fünfbältrigen β -Faltblatt-Propellers des GH-Clans GH-J zugeordnet. Diese Struktur bildet sich aus sternförmig und antiparallel orientierten β -Faltblatt-Sequenzen, die am Außenrand des gebildeten Trichters durch Loop-Strukturen aus mehreren α -Helices mit 3_{10} -Geometrie stabilisiert werden. Meng und Fütterer (2003) konnten durch Röntgenstrukturanalyse zeigen, dass die Oberfläche eine tiefe, stark negativ geladene zentrale Tasche aufweist, welche die hochkonservierten AS-Sequenzmotive VWD₍₈₆₎, EWSG₍₁₆₅₎, RDP₍₂₄₈₎ bzw. DEIER₍₃₄₃₎ einschließt und genau ein Saccharosemolekül bindet. Enzymvarianten mit Mutationen in diesen Sequenzen weisen einen starken Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit bis zur völligen Inaktivierung auf. Es konnten drei katalytisch aktive Aminosäurereste in beiden Glycosidhydrolase Familien identifiziert werden: Asp86, Asp247 und Glu342 (Meng und Fütterer, 2003; Pons *et al.* 2004) (Tab. 2.4.2).

Tab. 2.4.2: Sequenzmotive im aktiven Zentrum von Glycosidhydrolasen (Lammens *et al.*, 2009).

Familie	PDB-ID	Motiv			
		„WMNDPNG“	„WSGSAT“	„RDP“	„ED“
GH68	1OYG	DVWDSWP	WSGSAT	RDP	IERAN
	1W18	WVWDTWT	WSGSSR	RDP	TERPQ
GH32	1ST8	WMNDPNG	WSGSAT	RDP	WECPD
	1UYP	WMNDPNG	FSGSAV	RDP	IECPD
	1Y4P	WMNDPNG	FSGSAV	RDP	WECPG
	2AC1	WMNDPNG	WSGSAT	RDP	WECPD

Röntgenstrukturanalysen gibt es bisher nur von wenigen Levansucrasen aus *Bacillus subtilis* (SacB, Meng und Fütterer, 2003; 2008), *Bacillus megaterium* (SacB, Strube *et al.*, 2011) und *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA, Martinez-Fleites *et al.*, 2005). Die Substratbindung durch die „katalytische Triade“ konnte in Co-Kristallisations-Experimenten mit Saccharose bzw. Raffinose nachgewiesen werden (Meng und Fütterer, 2003; 2008).

Bereits 1974 postulierten Chambert *et al.* für die Levansucrase aus *Bacillus subtilis* einen Double-Displacement-Reaktionsmechanismus (Ping-Pong-Mechanismus, Kapitel 2.6.1). Nach Seibel *et al.* (2006 b), Abb. 2.4.4) wechselt der Furanosering des Saccharose-Enzym-Komplexes begünstigt durch die Deformation zwischen 3T_4 und E_4 in die E_4 -Konfiguration, welche den nukleophilen Angriff durch Asp86 ermöglicht. Das entstehende E_4 -

Oxocarbenium-Ion reagiert mit Asp86 zum kovalent verknüpften Enzym-Fructosyl-Komplex, welcher schon 1976 von Chambert und Treboul isoliert werden konnte. Die Glutaminsäure (Glu342, Säure/Base-Funktion) wirkt als Protonendonator/-akzeptor für die Ausbildung einer neuen glycosidischen Bindung, während die Asparaginsäure (Asp247) die Stabilisierung des Übergangszustandes bewirkt (Meng und Fütterer, 2003; Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

Die katalytische Reaktionsabfolge ist von einem dichten Netzwerk komplex interagierender Aminosäurereste koordiniert, welche durch Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung des aktiven Zentrums, der Übergangszustände und der ES-/EF-Komplexe beitragen.

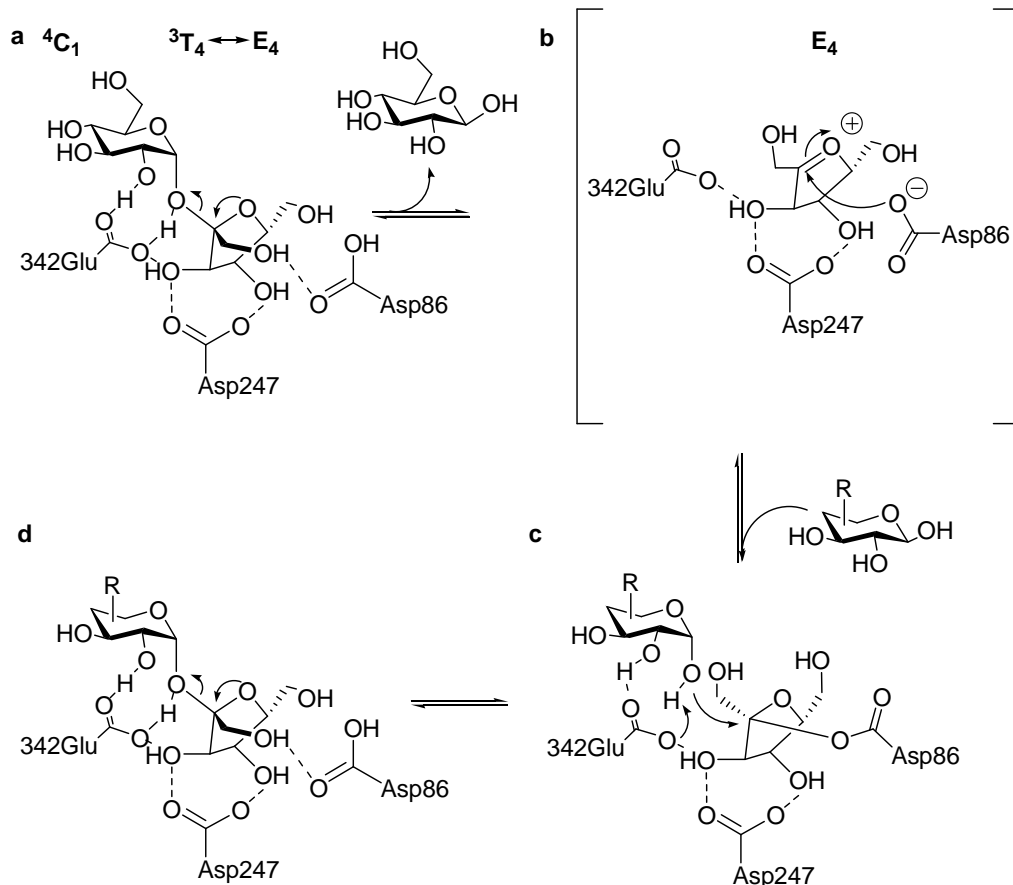


Abb. 2.4.4: Transfructosylierungsmechanismus für die Levansucrase aus *Bacillus subtilis* nach

Seibel *et al.* (2006 b) (Konfigurationen: C: chair; T: twist; E: envelope);

a) Saccharosebindung im aktiven Zentrum; b) Ausbildung eines Oxocarbenium-Ions vom Fructosylrest und der nukleophile Angriff von Asp86; c) kovalenter Enzym-Fructosyl-Komplex und Akzeptorkoordination durch Säure/Base-Funktion von Glu342; d) Bildung des Akzeptorproduktes.

Nach Davies *et al.* (1997) wird das katalytische Zentrum von Fructosyltransferasen in einzelne Subsites unterteilt: der Fructosyltransfer findet zwischen Subsite -1 und +1 statt, also zwischen Aminosäuren, welche mit Saccharose räumlich direkt in Wechselwirkung stehen. Die Subsite -1 beinhaltet die Aminosäuren W85, **D86**, W163, R246 und **D247** und die Subsite +1 aus R246, E340, **E342** und R360 (Ozimek *et al.*, 2006).

Diese Subsites beinhalten Aminosäurereste, deren Austausch die katalytischen Eigenschaften direkt beeinflussen (Aminosäurenummer ist analog zur *Bacillus subtilis* Sequenz nach Meng und Fütterer, 2003):

- reduzierte Polymerisierungsaktivität: R360 (Chambert und Petit-Glatron, 1991; 1993);
- gesteigerte Hydrolyse: D247 (Batista *et al.*, 1999, Song und Jacques, 1999 b)
- gesteigerte FOS-Bildung: S164 (Ortiz-Soto *et al.*, 2008), N242 (Subsite +2, Beine *et al.*, 2008; Homann *et al.*, 2007), Y247, K373 (Strube *et al.*, 2011)
- veränderte Akzeptorspezifität: Y429, R433 (Ortiz-Soto *et al.*, 2008)

2.4.2.3 Fructosyltransferase SacB aus *Bacillus subtilis*

Das im Allgemeinen aerobe, sporulierende, stäbchenförmige Bodenbakterium *Bacillus subtilis* gehört zu den bestuntersuchten gram-positiven Bakterien. Das Genom wurde vollständig sequenziert und enthält 4100 identifizierte Gensequenzen (Kunst *et al.*, 1997). Es gibt zwei strukturell verwandte Gene in *B. subtilis*, welche mit *sacA* für ein endozelluläres, saccharolytisches Enzym und mit *sacB* für eine extrazelluläre Levansucrase codieren (Steinmetz *et al.*, 1985).

Bacillus subtilis besitzt ein hohes Potential zur Enzymsekretion (Ara *et al.*, 2007), was im Fall der nativen extrazellulären Levansucrase SacB durch Saccharose induziert werden kann (Dedonder, 1960; Prestidge und Spizizen, 1969). Nachdem Delfour (1981) die Aminosäuresequenz der Levansucrase SacB veröffentlichte, konnte die *sacB*-Gensequenz aus *Bacillus subtilis* Marburg Stamm 168 hinsichtlich der genomischen Regulation untersucht (Steinmetz *et al.*, 1983), isoliert und in *E. coli* exprimiert werden (Gay *et al.*, 1983). Durch Mutationen in den Gensequenzen *sacS*, *sacU*, *sacQ* und *pts* (phosphotransferase system) kann die Regulation der *sacB*-Expression beeinflusst werden (Steinmetz *et al.*, 1985).

Die extrazelluläre Levansucrase SacB besteht aus einem Polypeptid Einzelstrang aus 444 Aminosäuren, welcher kein Cystein enthält und ein 50 kDa großes Enzym bildet (Abb. 2.4.5).

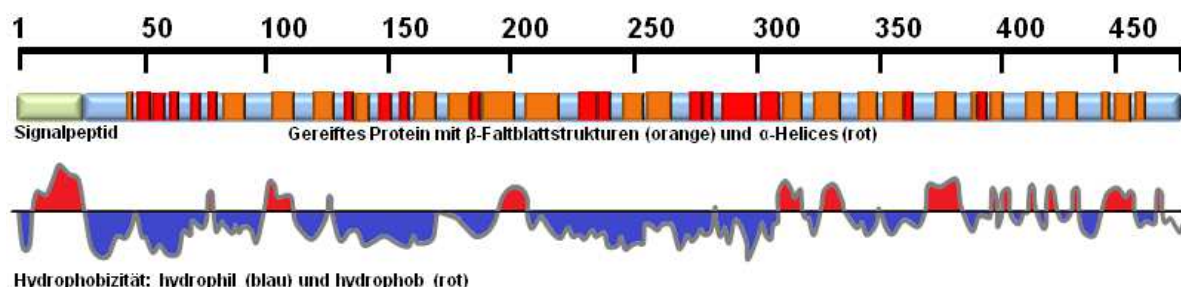


Abb. 2.4.5: lineare Darstellung der Struktur(elemente) der Levansucrase SacB aus *Bacillus subtilis* Stamm 168 (RSCB Protein Data Bank, PDB-Code: 1OYG, Meng und Fütterer, 2003).

Die Sekretion kann durch Fe^{3+} -Zugabe stimuliert werden. Fe^{3+} bindet zwar nicht, besitzt allerdings wie Ca^{2+} einen stabilisierenden Effekt auf das Exoenzym (Chambert *et al.*, 1990; Petit-Glatron *et al.*, 1990). Das N-terminale und 29 Aminosäuren lange Signalpeptid des intrazellulären Vorläuferproteins vermittelt als Lipidmembrananker den transmembranen

Transport und wird anschließend durch eine Signal-Peptidase (SPase) abgespalten (Tjalsma *et al.*, 2000; Petit-Glatron und Chambert, 1992).

Durch Ethanol-fällung kann aus dem *Bacillus subtilis* Kultivierungsüberstand kristallisationsfähige FTF isoliert werden (Berthou und Laurent, 1974), was schon 1980 durch Röntgenstrukturanalyse zu ersten Enzymmodellen durch Proteinkristalle mit 3,8 Å Auflösung führte (Le Brun und van Rapenbusch, 1980). Eine hochaufgelöste Röntgenstrukturanalyse mit 1,5 Å Auflösung führte durch Meng und Fütterer (2003; 2008) zur vollständigen Aufklärung der fünfblättrigen β -Propeller-Struktur (Abb. 2.4.6) sowie der Zuordnung katalytisch aktiver Aminosäuren. AS-Veränderungen im noch nicht vollständig geklärten Transfructosylierungsmechanismus (Kapitel 2.4.3.1) bieten bei der SacB durch kinetische Veränderungen und rationales Enzymdesign weiteres Optimierungspotential bei der FOS-Produktion und technischen Anwendung.

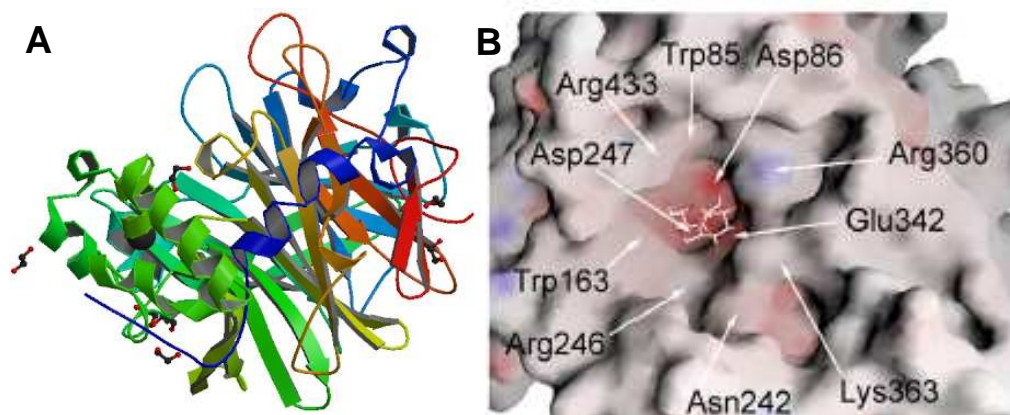


Abb. 2.4.6: A) räumliche Struktur; B) aktives Zentrum der Levansucrase SacB aus *Bacillus subtilis* Stamm 168 (Meng und Fütterer, 2003).

Die in der Arbeit verwendete Fructosyltransferase stammt aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871, welche zunächst homolog und später in zwei unterschiedlichen Varianten rekombinant in *Escherichia coli* produziert und charakterisiert wird. Nach Cheetham *et al.* (1989) liegt der optimale pH bei 5,0 und die Thermostabilität lässt bei ≥ 45 °C rapide nach. Bis 40 °C zeigt sich kein Einfluss auf die Enzymstabilität und der K_M für Saccharose beträgt 0,2 M, wobei die Reaktion durch Glucose inhibiert werden kann ($K_i = 0,7M$). Gegenüber anderen Levansucrasen weist die FTF aus *B. subtilis* NCIMB 11871 äußerst geringe Polymerbildungseigenschaften auf und besitzt eine breite Substratspezifität, die neben Saccharose auch Raffinose, Stachyose oder Verbascose als Fructosyldonor einschließt (Cheetham *et al.*, 1989). Zudem kann eine Vielzahl an Akzeptoren fructosyliert werden (Kapitel 2.4.4). Akzeptorprodukte, wie Saccharosederivate, können als Substrat zur zielgerichteten Synthese definierter Oligosaccharidstrukturen eingesetzt werden, wobei eine Variabilität durch unterschiedliche Pyranosylstrukturen vorliegt.

2.4.3 β -Fructofuranosidasen

β -Fructofuranosidasen (EC 3.2.1.26) werden auch als Invertasen bzw. Saccharasen bezeichnet, da sie die hydrolytische Spaltung von Saccharose zu Glucose/Fructose (Invertzucker) katalysieren. Diese Enzyme werden in Pflanzen, Hefen, Pilzen und Bakterien für den wirtsspezifischen Zuckermetabolismus exprimiert und zählen zu den Glycosidhydrolasen der Familie GH68 und GH32. Im Gegensatz zur Familie GH68 mit β -Fructofuranosidasen prokaryotischen Ursprungs umfasst GH32 zudem die eukaryotischen Invertasen, welche sich ebenfalls auf die stark konservierte strukturelle Homologie des 5-fach β -Faltblatt-Propellers (Clan GH J) begründet. Familie GH32 schließt zudem eine C-terminal angehängte Sandwich- β -Faltblattstruktur ein. Es gibt eine Vielzahl zellwand- bzw. membrangebundener, vakuolärer oder extrazellulärer Glycosidhydrolasen, welche sich jedoch trotz molekularer und struktureller Ähnlichkeiten funktionell unterschiedlich verhalten (van den Ende *et al.*, 2009).

Die Sekretion wird durch das natürliche Substrat Saccharose induziert und durch ein Signalpeptid vermittelt. Durch posttranslationale Modifikation besitzen eukaryotische Invertasen eine hochglycosylierte Oberfläche.

Die bekannteste extrazelluläre Invertase (Suc2) stammt aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, welche zudem sechs weitere genomische Gensequenzen intrazellulärer Invertasen beinhaltet (suc1 - 5, suc7 und suc8; Carlson und Botstein, 1983; Naumov und Naumova, 2010). Durch das Ausschalten der Suc2 ist eine heterologe sekretorische Invertaseexpression in diesem etablierten Produktionsstamm möglich.

Invertasen besitzen drei hochkonservierte Aminosäurenmotive, welche durch NDPNG, RDP und EC die AS-Triade Asp (Nukleophil), Asp (Stabilisation) und Glu (Säure/Base-Funktion) im katalytischen Zentrum zwischen Subsite -1 und +1 einschließt.

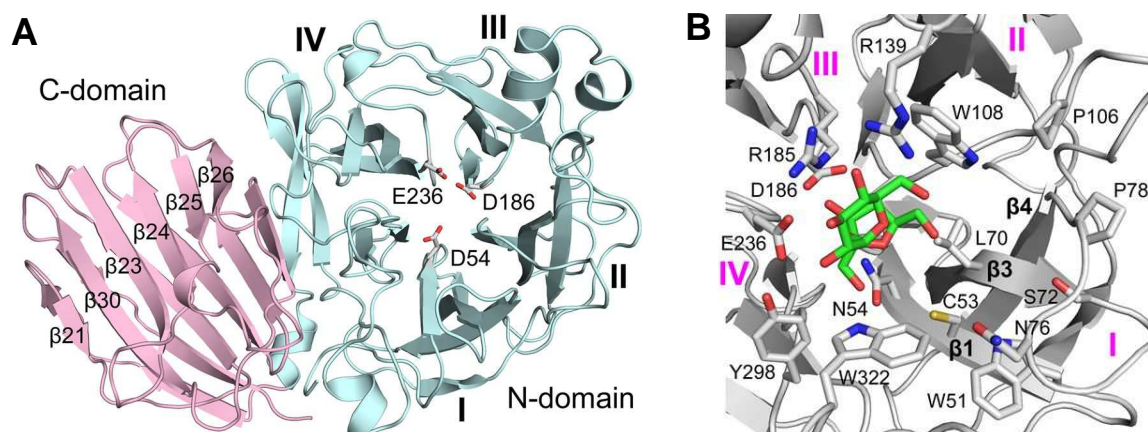


Abb. 2.4.7: A: N- und C-Domäne, katalytische Triade der AuLFTase aus *Arthrobacter ureafaciens*; B: aktives Zentrum des AuLFTase(D54N)-Saccharose-Komplexes (Park *et al.*, 2012).

Die Arbeitsgruppe Park *et al.* (2012) veröffentlichte eine hochaufgelöste Co-Kristallstruktur der Levan-Fructotransferase (AuLFTase aus *Arthrobacter ureafaciens*, GH32, Abb. 2.4.7, A) mit gebundener Saccharose (2,2 Å) und Levanbiose (2,3 Å). Während die Subsite -1 den Fructosyl- und Subsite +1 den Glucosylrest der Saccharose bindet, katalysieren

D54/D186/E236 bei der AuLFTase die Reaktion. Die Aminosäurereste in der polaren Tasche des Enzyms bilden untereinander und zum Substrat ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken- und van-der-Waals-Wechselwirkungen aus (Abb. 2.4.7, B). Dies unterstützt essentielle katalytische Funktionen und stabilisiert Übergangszustände. Der nicht-reduzierende Fructosylrest des Difructosaccharids Levanbiose kann durch Wechselwirkungen der verlängerten Tasche von Subsite -2 das Molekül ebenfalls als alternatives Substrat in der katalytischen Tasche positionieren (Park *et al.*, 2012). Die C-terminale Sandwich-Domäne hat lectinähnliche Kohlenhydraterkennungseigenschaften, welche die Bindung von Saccharose bzw. Fructanstrukturen vermittelt (Lammens *et al.*, 2009; Alvaro-Benito *et al.*, 2012).

Neben der hydrolytischen Spaltung von Sacchariden besitzen β -Fructofuranosidasen zudem ein hohes Potential für (intramolekulare) Transfructosylierungsreaktionen (Yun, 1996; Yanai *et al.*, 2001). In Gegenwart hoher Saccharosekonzentrationen ($> 0,2$ M) nimmt der Einfluss von Wasser als Akzeptor für die hydrolytische Spaltung ab und das Reaktionsgleichgewicht verschiebt sich primär auf die Transfructosylierungsreaktion. Es können Saccharoseanaloga bzw. FOS aus Substrat- und/oder Akzeptorreaktionen mit beispielsweise Xylose, Galactose, Maltose, Isomaltose, Zuckeralkoholen und deren fructosylierten Produkten entstehen (Nakada *et al.*, EP 0780470, 2001). β -(2 \rightarrow 6)-verknüpfte FOS (6-Kestose, 6-Nystose) können beispielsweise so mit Invertasen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Rhodotorula dairenensis*, etc. hergestellt werden (Straathof *et al.*, 1986, De Abreu *et al.*, 2011, Lafraya *et al.*, 2011; Alvaro-Benito *et al.*, 2012; Gutierrez-Alonso *et al.*, 2009). β -(2 \rightarrow 1)-verknüpfte FOS (1-Kestose, 1-Nystose) können mit β -Fructofuranosidasen aus *Aspergillus niger* (Suc1, SucB), *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus oryzae*, *Arthrobacter globiformis* etc. (Zuccaro *et al.*, 2008; Goosen *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2006, Kurakake *et al.*, 2010; Win *et al.*, 2004) produziert werden. Auch eine Verlagerung des Produktspektrums von β -(2 \rightarrow 6) zu β -(2 \rightarrow 1)-verknüpften FOS bzw. Neokestose konnte durch Mutation der Subsite +1/+2 (Q228/N254) bei einer Invertase aus *Schwanniomyces occidentalis* beobachtet werden (Alvaro-Benito *et al.*, 2012).

Die Invertasesekretion ist in *Aspergillus niger* Stämmen besonders effektiv, da 9 % des nativ sekretierten Gesamtproteins Invertaseaktivität besitzt (Boddy *et al.*, 1993). Es wurden bisher drei extrazelluläre β -Fructofuranosidasen in *Aspergillus niger* Stämmen identifiziert und charakterisiert Suc1, Suc2 (Wallis *et al.*, 1997), und FopA (Yanai *et al.*, 2001).

2.4.3.1 β -Fructofuranosidase Suc1 aus *Aspergillus niger*

Die native β -Fructofuranosidase Suc1 besteht aus 566 Aminosäuren und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 61,333 kDa (pI 4,79) (siehe auch Kapitel 4.2.2.2). Die 23 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz des Precursorproteins (589 AS) wird im Verlauf der posttranslationalen Modifikation abgespalten. Durch die N-glycosylierten Asparaginreste besteht die Masse des Enzyms zur Hälfte aus Kohlenhydraten, welche im nativen Zustand ein Molekulargewicht von 225 - 250 kDa und unter reduzierenden

Bedingungen im SDS-Gel eine Bande bei 115 kDa hervorrufen (Boddy *et al.*, 1993, Wallis *et al.*, 1997). Die Deglycosylierung mittels EndoH bzw. PNGaseF besitzt keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, so dass die Glycanhülle vielmehr für die Sekretion aus den Hyphen und als proteolytischer Schutz fungiert (Wallis *et al.*, 1997). Die Suc1 lässt sich aus dem Kultivierungsüberstand durch Querstromfiltration und anschließende Gel-Permeations-Chromatographie aufkonzentrieren und aufreinigen (Boddy *et al.*, 1993; Homann, 2009). Eine heterologe Expression konnte erstmals durch Berges *et al.* (1993) in *Trichoderma reesei* bei der Etablierung eines suc1-Cosmid-Transformationsmarkers für suc⁻-Stämme durchgeführt werden.

Die Transfructosylierung führt mittels eines hochkonzentriert eingesetzten Substrates (Saccharose/Saccharoseanaloga) zur Bildung von 1-Kestose und 1-Nystose bzw. deren Derivaten (Zuccaro *et al.*, 2008; Homann, 2009).

Die optimalen Transfructosylierungsbedingungen für die Suc1 liegen bei pH 5,5 und 50 bzw. 55 °C (Zuccaro *et al.*, 2008; Boddy *et al.*, 1993). Die Reaktion verläuft nicht nach einer Michaelis-Menten-Kinetik, so dass die kinetische Charakterisierung mit dem Substrat Saccharose zwei unterschiedliche K_M -Werte von 30 bzw. 160 mM ergibt (Wallis *et al.*, 1997). Eine *in silico* Analyse der 3-dimensional dargestellten Suc1-Struktur besitzt im Vergleich zu einer Exo-Inulosucrase aus *Aspergillus awamori* ein deutlich geweitetes und polares aktives Zentrum, was die Anlagerung von Akzeptormolekülen und somit die FOS-Bildung begünstigt (Homann, 2009).

2.4.4 Herstellung von Saccharoseanaloga mittels Akzeptorreaktionen

1944 stellten Hestrin und Avineri-Shapiro bei der Levansucrase aus *Aerobacter levanicum* inhibitorische Effekte der Levansynthese durch Zugabe diverser Saccharide fest. Eine struktursystematische Variation der stereochemischen Position von Hydroxylgruppen ergab für diese Enzymreaktion, dass einige Saccharide als gute Fructosylakzeptoren fungieren, was zu einer Inhibierung der Levanbildung führt (Hestrin und Avigad, 1958). Erstmals konnten Avigad *et al.* (1956) und Feingold *et al.* (1957) mit der Levansucrase die Saccharoseanaloga Xyl-Fru und Gal-Fru synthetisieren. Die Transfructosylierungsausbeute lässt eine Differenzierung zwischen inerten, schlechten und guten Akzeptoren zu. Besonders die Monosaccharide D/L-Xylose, D/L-Glucose, D/L-Galactose, D/L-Arabinose, D-Mannose, D-Fucose und die Disaccharide Maltose, Cellobiose, Lactose, Melibiose und Isomaltose (bzw. deren Triosen) zeigen bei Glycosidhydrolasen Akzeptoreigenschaften (Hestrin und Avigad, 1958; Cheetham *et al.*, 1989; Baciú *et al.*, 2005; Seibel *et al.*, 2005, Seibel *et al.*, 2006 b). Überdies zeigen auch Zuckeralkohole wie Sorbitol und Mannitol Akzeptoreigenschaften. Durch die enzymespezifische Substrat-/Akzeptortoleranz besteht ein hohes Potential, unterschiedliche Produkte zu synthetisieren.

Bei der Synthese von Saccharoseanaloga mit Monosaccharidakzeptoren resultiert mit der D-Konfiguration eine α -(1,2)- β -Verknüpfung bzw. bei der L-Konfiguration eine β -(1,2)- β -Verknüpfung im Disaccharid (Levansucrase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871, Abb. 2.4.8).

Monosaccharide als Akzeptoren müssen im molaren Überschuss zum Substrat eingesetzt werden, da sie eine geringere Spezifität als das Substrat besitzen und mit diesem um die Bindestelle konkurrieren. Kinetische und *in-silico*-Dockingexperimente mit Saccharoseanaloga ergeben, dass es nur eine Akzeptorbindestelle gibt, welche identisch zur Substratbindestelle ist (Seibel *et al.* 2006 b).

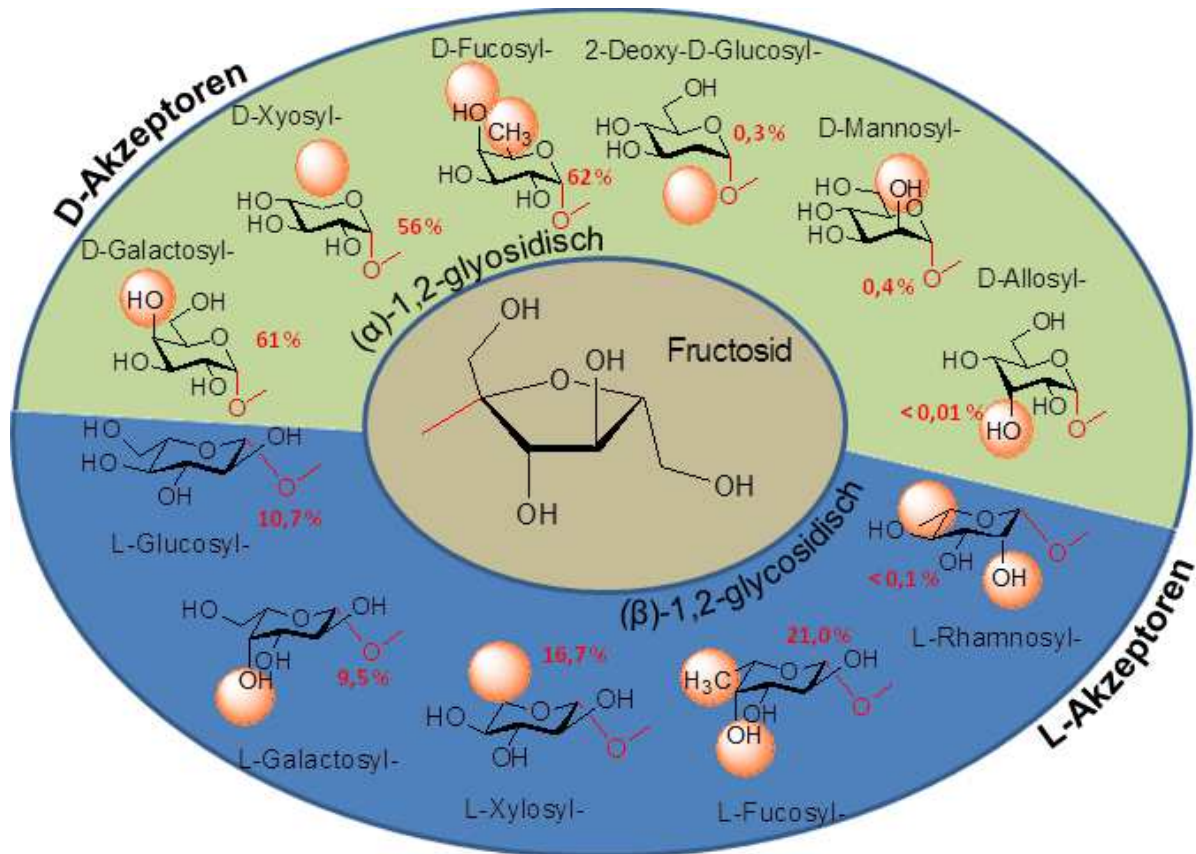


Abb. 2.4.8: Saccharoseanaloga aus der Akzeptorreaktion der Levansucrase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 nach Seibel *et al.* 2006 b (blaue/grüne Fläche: D-/L-Monosaccharid-akzeptoren, orange Kreise: Konfigurationsabweichungen zur D- bzw. L-Glucose, rot: Ausbeute am volumetrischen Produktmaximum).

Zur enzymatischen Synthese von Saccharoseanaloga mittels der Levansucrase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 kann als Fructosyldonor sowohl das natürliche Substrat Saccharose als auch Raffinose verwendet werden (Abb. 2.4.9).

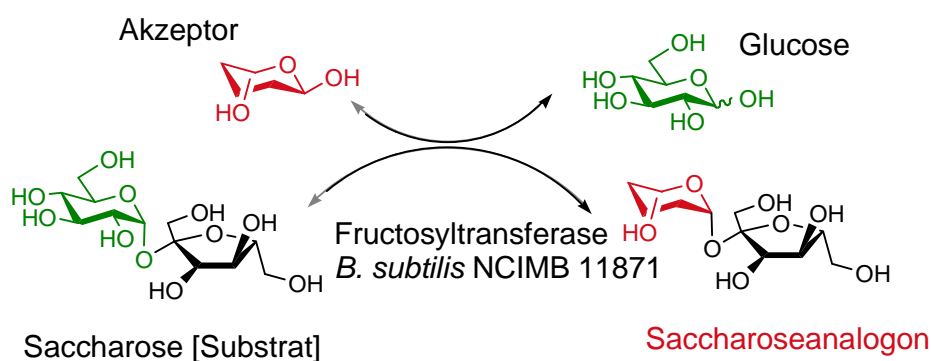
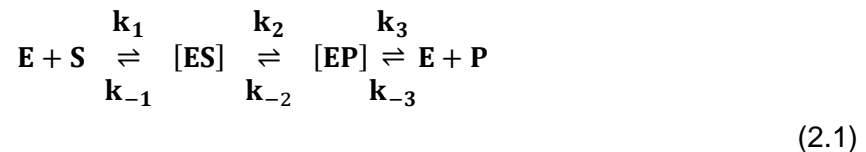


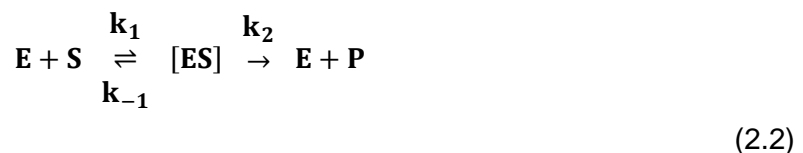
Abb. 2.4.9: Akzeptorreaktion der Levansucrase aus *Bacillus subtilis*.

2.5 Enzymkinetische Reaktionsparameter nach dem Modell von Michaelis Menten

Brown (1902) postulierte erstmals die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, was zu einer Sättigungskinetik führt. Die Geschwindigkeitskonstante k_1 entspricht nach Lasch (1987) zunächst der Reaktion von Enzym (E) und Substrat zum Enzym-Substrat-Komplex (ES). Dieser reagiert entweder weiter zum Produkt (P) oder in der Rückreaktion zum Substrat (S). Nach der Dissoziation vom Enzym steht das freie Enzym der Reaktion wieder zur Verfügung (Gleichung 2.1).



Unter der vereinfachenden Annahme, dass in einem Einsubstrat-System der Enzym-Substrat-Komplex nach der gleichgewichtsabhängigen Substratbindung (k_1/k_{-1}) irreversibel zu Produkt und Enzym zerfällt, ist die Reaktion durch die Produktbildung (k_2) charakterisiert (Gleichung 2.2).



Es wird zudem von der Steady-State-Geschwindigkeit ausgegangen, wobei die Konzentration an Enzym ($d[E]/dt = d[ES]/dt = 0$) gegenüber der eingesetzten Substratmenge sehr klein ist ($[S] \gg [E]_0 \gg [ES]$). Nach Michaelis und Menten (1913) befindet sich E und S mit [ES] in einem schnellen thermodynamischen Gleichgewicht, welches unter der Voraussetzung $k_1 \sim k_{-1} \gg k_2$ zur Ableitung der Reaktionsgeschwindigkeit führt (Gleichung 2.3).

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.3)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \text{Michaelis-Konstante [M]} \quad (2.3.1)$$

$$v_{\max} = k_2 \cdot [E]_0 \text{ [M/s]} \quad (2.3.2) \text{ mit } [E]_0 = [E] + [ES] \text{ (Erhaltungsgleichung, 2.3.3)}$$

Die Michaelis-Menten-Gleichung beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration als eine Sättigungshyperbel (Abb. 2.5.1). Die Michaelis-Konstante (K_M) ist die Substratkonzentration, bei der die Enzymreaktion bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit abläuft. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) ist proportional zur Menge des eingesetzten Enzyms (E_0).

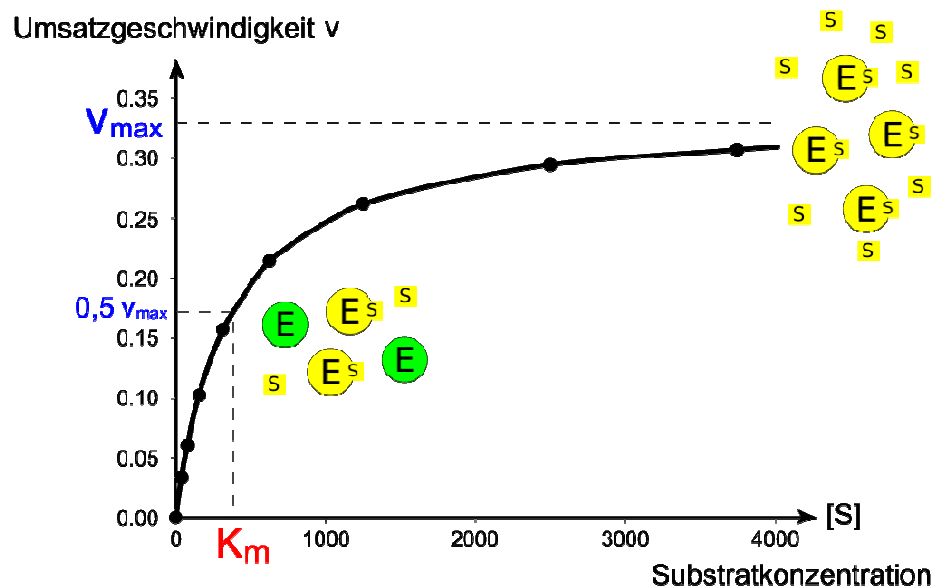


Abb. 2.5.1: $v/[S]$ -Diagramm einer enzymatischen Michaelis-Menten-Kinetik mit Sättigungsgrad des Enzyms (Yikrazuul, 2010).

Der Modellansatz von Michaelis und Menten berücksichtigt jedoch weder Mehrsubstrat-Reaktionen noch inhibitorischen Effekte.

2.6 Mehrsubstratreaktionen

In der Natur kommen vorwiegend Enzymreaktionen mit zwei oder mehr Substraten vor. Zur Darstellung des Reaktionsablaufes solcher Mehrsubstratreaktionen werden die Teilschritte der Reaktion in einer Sequenz der Substratanlagerung, (Übergangs-)Komplexbildung und Produktfreisetzung aufgeschlüsselt. Man unterscheidet im Allgemeinen die sequenziellen Mechanismen „Random“ und „Ordered“ (Bindung/Dissoziation zufällig bzw. obligatorisch geordnet) vom Ping-Pong-Mechanismus (Abb. 2.6.1).

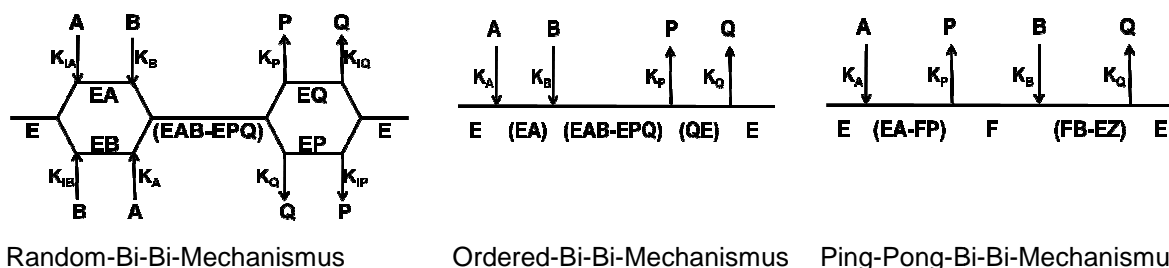


Abb. 2.6.1: Zwei-Substrat-Kinetikmodelle nach Cleland (1963 a - c).

Die wechselseitige Abhängigkeit der verschiedenen Substrate bzw. ggf. Produkte erschwert ein mathematisches Modell der Geschwindigkeitsgleichungen, so dass nur makrokinetische Ansätze eine Näherung durch Multiplikation der Michaelis-Menten-Terme ergeben.

2.6.1 Ping-Pong Mechanismus (Double-Displacement Mechanismus)

Der Reaktionsmechanismus der Fructosyltransferase kann mit dem 1963 von Cleland aufgestellten kinetischen Modell des Ping-Pong Mechanismus beschrieben werden. Das Enzym durchläuft grundsätzlich zwei Teilreaktionen: Eine reaktive Zwischenform aus der ersten Reaktion ist für die Reaktion mit dem zweiten Molekül notwendig. Die Gesamtreaktion kann am Beispiel der Levansynthese (A: Fructosylakzeptor) mit Saccharose als Fructosyldonor (D) in folgende Teilschritte unterteilt werden (Abb. 2.6.2):

Substratbindung (Sac), Freisetzung von Glucose (Glu) unter Ausbildung des Enzym-Fructosyl-Komplexes (E-Fru), Anlagerung des Akzeptors (Levan_n), Übertragung des Fructosylrestes und schließlich die Freisetzung des fructosylierten Produktes (Levan_{n+1}) (s.a. Kapitel 2.4.3.1).

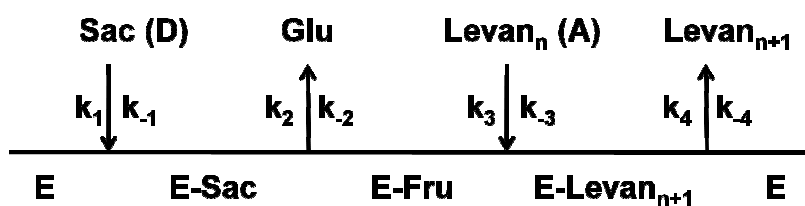


Abb. 2.6.2: Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus für die Levansucrase nach Cleland (1963 a).

Nach Song und Jacques (1999 b) ist die Fructosylierung der geschwindigkeitbestimmende Schritt der Gesamtreaktion. Das Akzeptormolekül wird sowohl bei Fructosyltransferasen als auch β -Fructofuranosidasen jeweils um eine einzelne Fructosyleinheit verlängert (Antosova und Polakovic, 2001).

Abgeleitet vom Reaktionsmechanismus nach Cleland (1963 b) gilt für die Levansucrase aus *Bacillus subtilis* folgende Gleichung 2.4 für die Initialgeschwindigkeit.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[D] \cdot [A]}{K_D \cdot [A] + K_A \cdot [D] + [D] \cdot [A]} \quad (2.4)$$

D: Fructosyldonor; A: Fructosylakzeptor; K_D bzw. K_A : Michaelis-Konstante für Donor bzw. Akzeptor

Inhibitorische Effekte durch das Substrat, Produkt oder andere Moleküle können durch die Erweiterung von Inhibitionstermen entsprechend berücksichtigt werden.

2.7 Einflussfaktoren auf enzymkatalysierte Reaktionen

Enzymatische Reaktionen verlaufen im Allgemeinen unter gemäßigten Umgebungsbedingungen in wässrigem Milieu. Die Proteinkonformation wird durch die Wechselwirkungen der Aminosäurereste zueinander stabilisiert und ist daher gegenüber denaturierenden Störeinflüssen von Temperatur, pH und Ionenstärke beeinflussbar. Überdies kann die Enzymaktivität durch Inhibitoren verringert oder durch stabilisierende Effekte in Gegenwart von aktivierenden Substanzen gesteigert werden.

2.7.1 Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke

Katalytisch aktive Aminosäurereste enthalten oftmals ionisierbare Gruppen (H, R, K, E, D; ~ 65 % (Bartlett *et al.*, 2002)). Die pH-abhängige Ladungsänderung essentieller Aminosäure-Seitenketten im aktiven Zentrum kann die Enzymaktivität direkt beeinflussen. Zudem wird die Tertiärstruktur durch elektrostatische Wechselwirkungen der Seitenketten stabilisiert, so dass die Katalyse indirekt durch Destabilisierung bzw. Konformationsänderung beeinflusst wird. Die Mehrheit der ionisierbaren Gruppen befindet sich an der Außenseite des Enzyms, welche mit dem Milieu in Wechselwirkung stehen und damit die physikalische Charakteristik des Enzyms prägen (Wilson und Goulding, 1991). Die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit verhält sich in der Summe aller AS-Ionisierungszustände entsprechend einer Gaußschen Normalverteilung als Glockenfunktion (Gleichung 2.5, Abb. 2.7.1).

$$y = y_0 + A \cdot e^{-\frac{(x-x_c)^2}{w^2}} \quad (2.5)$$

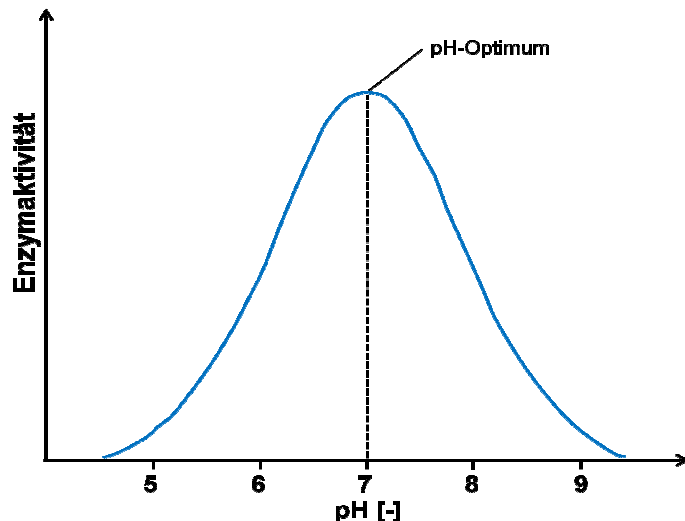


Abb. 2.7.1: pH-Abhängigkeit einer Enzymreaktion.

Am isoelektrischen Punkt (pI), also dem pH, bei dem keine Nettoladung aus der Gesamtheit aller Aminosäurereste vorliegt, ist meist die Löslichkeit aufgrund maximaler elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den Molekülen minimal.

Die Ionenstärke (I) gibt die effektive Konzentration der elektrischen Ladungen (z_i) in der Lösung an und hängt also von der Elektrolytkonzentration (M_i) ab (Gleichung 2.6) (Chmiel, 2011).

$$I = \frac{1}{2} \sum_i M_i \cdot z_i^2 \quad (2.6)$$

Entsprechend der Temperaturabhängigkeit des pH besteht nach Stoll und Blanchard (1990) kein signifikanter Einfluss für die verwendeten Puffer. Puffer mit hoher Ionenstärke können

sowohl den Fructosyltransfer auf Levan als auch die Hydrolyse des Polymers bei FTFs mindern (Yamamoto *et al.*, 1985). Für Cu^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} und Na^{+} werden inhibitorische Effekte durch ionische Wechselwirkungen bei Fructosyltransferasen aus *Bacillus subtilis* und β -Fructofuranosidasen aus *Aspergillus niger* beschrieben (Esawy *et al.*, 2008; Rubio und Maldonado, 1995).

2.7.2 Einfluss der Temperatur

Die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Reaktionen ändert sich exponentiell mit der Temperatur (Arrhenius, 1889), wobei dies hinsichtlich enzymkatalysierter Reaktionen durch thermische Denaturierungseffekte limitiert ist.

Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v_0) einer Reaktion ist als das Produkt aus Geschwindigkeitskonstante (k) und Fructosyl-Enzymkomplex ($[\text{E-Fru}]$) der Produktbildungsrate $d[\text{P}]/dt$ direkt proportional. Die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten wird nach Arrhenius (1889) in Gleichung 2.7 beschrieben.

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (2.7)$$

Die Aktivierungsenergie (E_A) entspricht der zur Produktumsetzung notwendigen Mindestenergie. Der mit der Temperatur steigende Energiegehalt der Reaktanden erleichtert die Umsetzung und führt zunächst zu einer Beschleunigung der Produktbildung. Die temperaturbedingten Konformationsänderungen führen jedoch oberhalb physiologischer Bedingungen rasch zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms (Abb. 2.7.2).

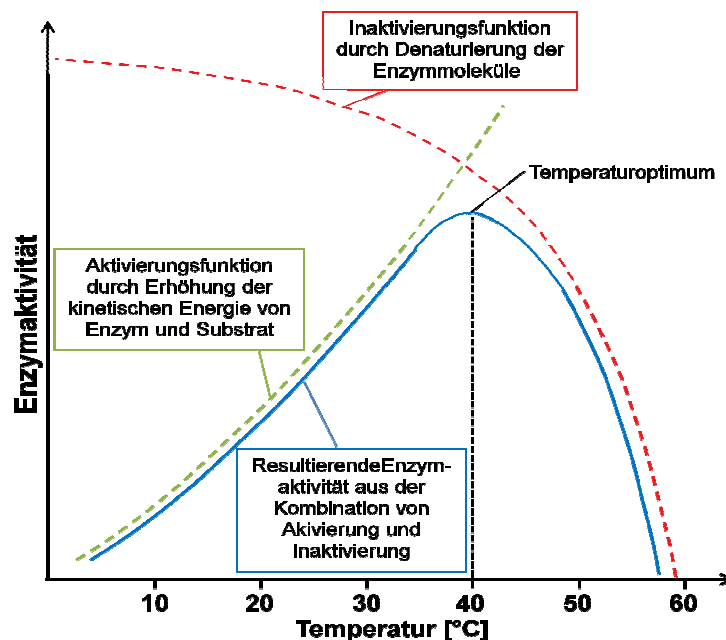


Abb. 2.7.2: Temperaturabhängigkeit einer Enzymreaktion.

Der Destabilisierungsprozess folgt einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, so dass die Inaktivierungsrate (k_i) der Gesetzmäßigkeit von Arrhenius (Gleichung 2.7) entspricht. Die Inaktivierungsrate kann bei der halblogarithmischen Auftragung der

Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gegen die Inkubationszeit aus der Steigung ermittelt werden. Daraus lässt sich die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der Enzymstabilität berechnen (Gleichung 2.8).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (2.8)$$

Die thermische Stabilität von β -Fructofuranosidasen wird durch Gegenwart hoher Saccharidkonzentrationen ($> 60\%$ w/v) positiv beeinflusst, so dass sich das Temperaturoptimum von $45 - 55\text{ }^\circ\text{C}$ sogar bis auf $65\text{ }^\circ\text{C}$ erhöhen lässt bzw. sich die Halbwertszeiten für einen technischen Prozess erhöhen (Fernandez *et al.*, 2007). Die Aktivität für Levansucrasen aus *Bacillus subtilis* konnte von Szwengiel *et al.* (2007) für 140 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in einem Membranverfahren aufrecht erhalten bzw. von Ortiz-Soto *et al.* (2008) mit einer Halbwertszeit von 52 min bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ detektiert werden.

2.7.3 Inhibierung

Untersuchungen zu inhibitorischen Effekten geben Aufschlüsse zum Reaktionsmechanismus sowie zum strukturellen Aufbau des aktiven Zentrums. Neben der denaturierenden Wirkung von Detergenzien und Ionen (Kapitel 2.6.1) konnten bei Fructosyltransferasen aus *Bacillus subtilis* lediglich Produktinhibierungen durch Glucose (Euzenat *et al.*, 1997; Chambert *et al.*, 1974) und bei β -Fructofuranosidasen aus *Aspergillus niger* Substratüberschussinhibierungen festgestellt werden (Goosen *et al.*, 2007).

Sowohl bei der Produktinhibierung als auch bei der Inhibierung durch Substratanaloga handelt es sich um eine kompetitive Hemmung, da der Inhibitor mit dem Substrat um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Zum einen verhindert der Produktkomplex [EP] (s. Gleichung 2.1) zunächst eine weitere Substratbindung und zum anderen resultiert aus der Anreicherung des Produktes eine zunehmende Beeinflussung der Hinreaktion durch die Rückreaktion (Gleichung 2.9).



Es handelt sich um einen reversiblen Effekt, der den K_M -Wert für $[\text{P}] > 0$ um den Term $K_M[\text{P}]/K_{PI}$ erweitert. Der hyperbolische Sättigungsverlauf (Abb. 2.5.1) verläuft bei Inhibierung flacher, wird jedoch mit $[\text{P}] \ll [\text{S}] \rightarrow \infty$ gegen v_{\max} streben. Die Hinreaktion wird durch das Produkt beeinträchtigt und nach Gleichung 2.10 beschrieben.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[\text{P}]}{K_{PI}}\right) + [\text{S}]} \quad (2.10)$$

$$K_{PI} = \frac{[\text{E}] \cdot [\text{P}]}{[\text{EP}]} = \frac{k_{P-1}}{k_{P1}} = \text{Michaelis-Produktinhibierungs-Konstante [M]} \quad (2.10.1)$$

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{ES}] + [\text{EP}]_I \quad (\text{Erhaltungsgleichung, 2.10.2})$$

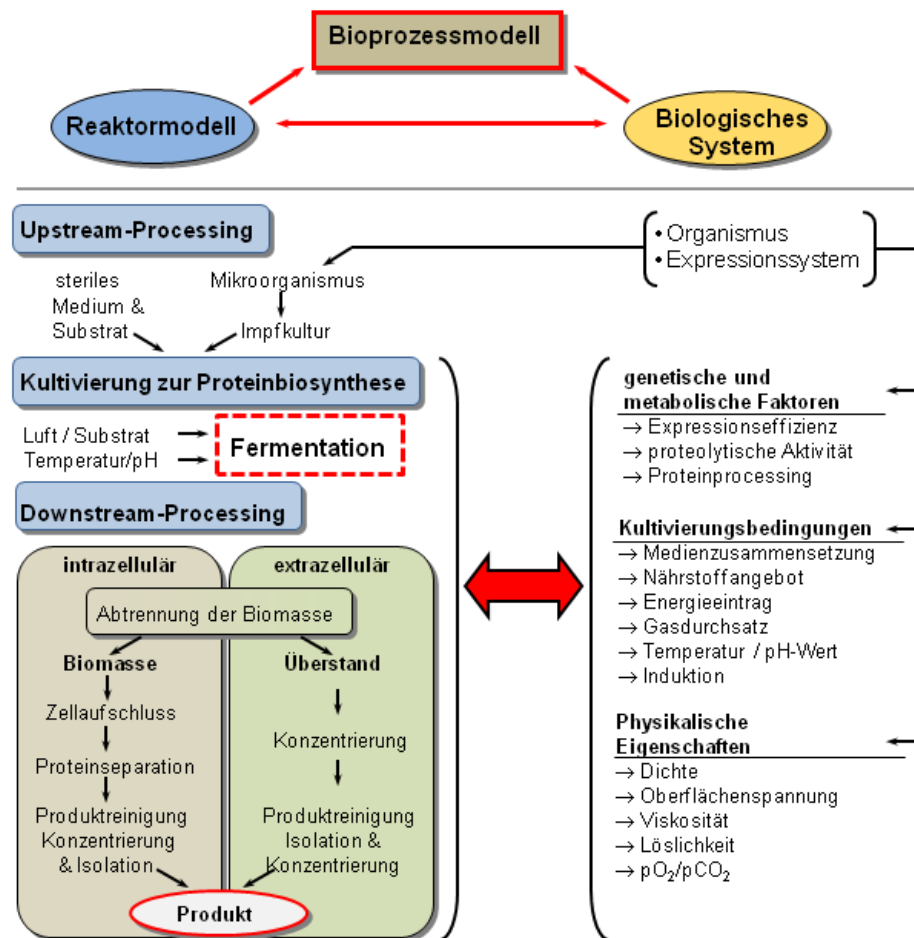


Abb. 2.8.1: Prozessstrukturierung zur Entwicklung und Optimierung intra- und extrazellulär produzierter Biokatalysatoren (nach Gölker, 1994; Dellweg, 1994).

Der filamentöse Pilz *Aspergillus niger* AB1.13 wurde im Institut für Mikrobiologie (TU Braunschweig) unter Leitung von Prof. Dr. Petra Dersch zur homologen Überexpression von Suc1 kultiviert. *Aspergillus niger* hat sich als industriell etablierter Produktionsstamm beim Einsatz von standardisierten Expressionskassetten für die Proteinüberexpression von 600 homologen und 2000 heterologen Pilzgenen bewährt (van den Berg *et al.*, 2012). Eine effektive Sekretion mit hoher Produktivität sorgt bei *Aspergillus* Stämmen verfahrenstechnisch für einen erleichterten Zugang im Downstream-Processing. Die posttranslationale Modifikation besitzt Relevanz für die Stabilität sowie die Sekretion eukaryotischer Proteine.

2.8.1 Mikrobielles Wachstum

Das Bakterienwachstum bei der statischen Kultivierung kann in vier Phasen unterteilt werden (Abb. 2.8.2). Die spezifische Wachstumsrate μ ist in der Anlaufphase durch die Adaption an die Umgebungsbedingungen sehr gering, steigt jedoch durch Nährstoffüberfluss in der zweiten Wachstumsphase exponentiell an. Nährstofflimitierungen und angereicherte Stoffwechselprodukte führen über einen stationären Zustand schließlich zu einer deutlich höheren Mortalitätsrate. Die mathematische Beschreibung der spezifischen Wachstumsrate

für die exponentielle Phase wurde 1949 von Monod in den Bezug zur Konzentration des limitierenden Substrates gebracht (Gleichung 2.13).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_s} \quad (2.13)$$

Die maximale Wachstumsrate μ_{\max} gilt für $[S] \gg K_s$, wobei K_s die Substratkonzentration für $\mu = 0,5 \cdot \mu_{\max}$ in Analogie zur Michaelis-Gleichung (2.3) wiedergibt.

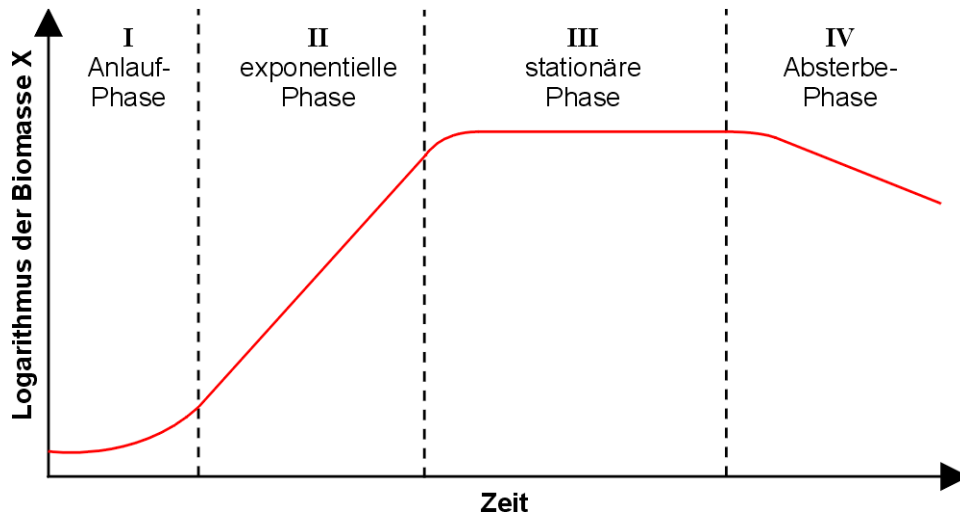


Abb. 2.8.2: Wachstumskurve von Bakterienkulturen (Schlegel, 1992).

Die Induktion erfolgt im Allgemeinen erst bei Erreichen hoher Zelldichten in der exponentiellen Wachstumsphase. Die progressive Zunahme von Biomasse und Produkt bewirkt oft auch Veränderungen der Viskosität, der Stoffübergänge und des pH-Wertes (Dellweg, 1994).

Die Wachstumskinetik bei filamentösen Pilzen in submerser Kultur setzt sich sehr komplex aus dem Längenwachstum der Hyphen und dem radialen Wachstum der Pellets zusammen, was in einer proportionalen Biomassezunahme zu t^3 resultiert (Koch, 1975).

2.9 Produktion rekombinanter Proteine mittels *Escherichia coli*

Bakterielle Produktionssysteme zur rekombinanten Proteinexpression zeichnen sich durch geringe Kosten, hohe Produktivität und eine einfache, schnelle Anwendung aus (Terpe, 2006). Die Plasmid-DNA des transfizierten Produktionsstammes wird über den Selektionsdruck eines Antibiotikums in der Zelle gehalten und enthält neben dem einklonierten Zielgen alle nötigen Merkmale zur Replikation und Transkription. Die genetisch vollständig charakterisierten und proteasedefizienten *Escherichia coli* Stämme BL21, K12 sowie deren Derivate eignen sich besonders hinsichtlich schneller Wachstumsraten, hoher erreichbarer Zelldichten mit günstigen Substraten und einer großen Auswahl von

Expressionsvektoren zur rekombinanten Proteinüberproduktion (Terpe, 2006). Eine Optimierung molekularbiologischer und verfahrenstechnischer Aspekte kann zu signifikant höheren Ausbeuten an Zielprotein führen, beispielsweise durch Expressionsvektordesign, erhöhte Plasmidstabilität bzw. Genkopienanzahl, Promotorstärke (transkriptionelle Regulation), mRNA-Stabilität, Translationsinitiierung und -termination (translationelle Regulation), Produktionsstamm, codon usage sowie durch die Umgebungsbedingungen zur Kultivierung und Expression (Jana und Deb, 2005).

Die rekombinante Proteinproduktion bewirkt durch die zusätzliche metabolische Belastung eine Verringerung der spezifischen Wachstumsrate. Der Bedarf an Energie und Stoffen für Wachstum, Vermehrung und Stoffwechsellaufrechterhaltung wird um den Betrag des expressionsbedingten Bedarfs zur Synthese des Fremdproteins gemindert. Die spezifische Wachstumsrate korreliert reziprok mit der Syntheserate des rekombinanten Proteins (Jensen und Carlsen, 1990).

Die hohen Expressionsraten können eine Stressantwort des Wirts bewirken, da durch die induzierte Überproduktion bis zu 60 - 70 % des synthetisierten Proteins aus Zielprotein bestehen kann (Baneyx und Mujacic, 2004; Jana und Deb, 2005). Eine Berücksichtigung der codon usage bei der Wahl des Expressionssystems (Vektor/MO-Stamm) kann die Ausbeute an heterologem Protein erhöhen, da es einerseits zu Limitierungen der intrazellulär verfügbaren Aminosäurereserven (Ramirez und Bentley, 1999) und andererseits stressbedingt zum Fehleinbau der Aminosäuren im Zielprotein kommen kann (Tsai *et al.*, 1988). Proteine mit selten verwendeten Wirtscodons können nicht effizient translatiert werden, so dass dieser Mangel durch Substitution der Gensequenz zugunsten häufig verwendeter Codons oder durch Co-Translation defizienter t-RNAs gemindert werden kann. Der **Codon Adaption Index (CAI)** bietet ein effektives Maß für die codon usage Abweichung (Sharp und Li, 1987) und steht außerdem nach Goetz und Fuglsang (2005) in Korrelation mit dem Transkriptionsgrad der mRNA. Die Co-Expression seltener tRNAs wie tRNA^{Arg}_{AGA/AGG} führt bei Brinkmann *et al.* (1989) zu signifikant höheren Proteinausbeuten und für tRNA^{Glu}_{GAA/GAG} bei Krüger *et al.* (1998) zu einer Steigerung der Translationsrate.

Die metabolische Belastung nach der Induktion kann nachteilige Auswirkungen auf die Plasmidstabilität und -qualität haben (Silva *et al.*, 2012) und schließlich in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen (Medienzusammensetzung, Wachstumsrate, Zelldichte, Temperatur, pH, Rührgeschwindigkeit, etc.) auch zum Plasmidverlust führen (Corchero und Villaverde, 1998).

2.9.1 Einfluss der Kultivierungsbedingungen und Medienzusammensetzung

Die Zusammensetzung des Kulturmediums kann erhebliche metabolische Wirkungen auf die Zellen als auch die Proteinproduktion haben (Makrides, 1996; Donovan *et al.*, 1996).

Die Nährstoffassimilation deckt den Energie- und Stoffwechsel des Mikroorganismus und erfordert die Bereitstellung eines ausgewogenen Verhältnisses an Makroelementen und essentiellen Spurenelementen. Bei der rekombinanten Proteinbiosynthese kommt neben der Kohlenstoffquelle insbesondere dem erhöhten Stickstoffbedarf eine besondere Bedeutung zu. Die Aufnahme von reduziertem Stickstoff ist physiologisch begünstigt und wirkt durch die Zugabe von Ammoniumsalzen einer Limitation entgegen.

Die Zugabe von komplexen Medienbestandteilen oder Aminosäuren führt zu einer Biomassesteigerung und zudem wird sowohl die Syntheserate als auch die Stabilität des Zielproteins erhöht (Donovan *et al.*, 1996). Mit dem komplexen Luria Bertani Medium können unter temperatur-, pH- und sauerstoffregulierten Wachstumsbedingungen Zelldichten von 1,0 g_{BTM}/l erreicht werden (Shiloach und Fass, 2005). Beim Vergleich unterschiedlicher Nährmedien konnten Hortsch und Weuster-Botz (2011) bei der batchweisen *E. coli* Kultivierung ohne pH-Regelung ein Maximum an spezifischer Proteinausbeute sowie an Biotrockenmasse von 14 g/l für konzentriertes Komplex-Medium erzielen.

Komplexmedien unterstützen Wachstum und Proteinexpression durch ein reichhaltiges Angebot an Aminosäuren, Vitaminen und Spurenelementen. Diese Medien sind allerdings kostenintensiv und durch die undefinierte Zusammensetzung wird eine Regulierung unter limitierenden Wachstumsbedingungen erschwert (Donovan *et al.*, 1996). In hoher Konzentration können Nährstoffe inhibierend auf das Wachstum wirken, Glucose > 50 g/l, Ammonium > 3 g/l, Eisen > 1,15 g/l, Magnesium > 8,7 g/l, Phosphor > 10 g/l (Riesenberg *et al.*, 1991). 10 - 30 % der verstoffwechselten Glucose werden unter aeroben Wachstumsbedingungen zu Acetat umgewandelt, welches sich im Medium anreichert und mit zunehmender Konzentration zu einer Inhibition der Biomassebildung und zu einer Reduktion der volumetrischen Produktivität an rekombinanten Proteinen führt (Tripathi *et al.*, 2009).

Kultivierungstemperaturen von ca. 37 °C führen bei *E. coli* zu maximalen spezifischen Wachstumsraten. Eine Reduktion der Temperatur bzw. der Induktorkonzentration kann sich infolge niedriger Expressionsraten günstig auf die korrekte Proteinfaltung auswirken. Zudem kann dies eine Verringerung von unlöslichen Proteinaggregaten bewirken, zugunsten höherer Löslichkeit und einer Verringerung der proteolytischen Degradation. Höhere Temperaturen (> 30 °C) begünstigen proteolytisch zugängliche Enzymkonformationen (Donovan *et al.*, 1996).

2.9.2 Bildung von inclusion bodies

Die Überexpression in *E. coli* führt zu einer starken Anreicherung von rekombinantem Protein im intrazellulären Raum, was zur Ausbildung unlöslicher Aggregate aus fehlgefalteten Proteinen (inclusion bodies, Einschlusskörper) führen kann. Bei

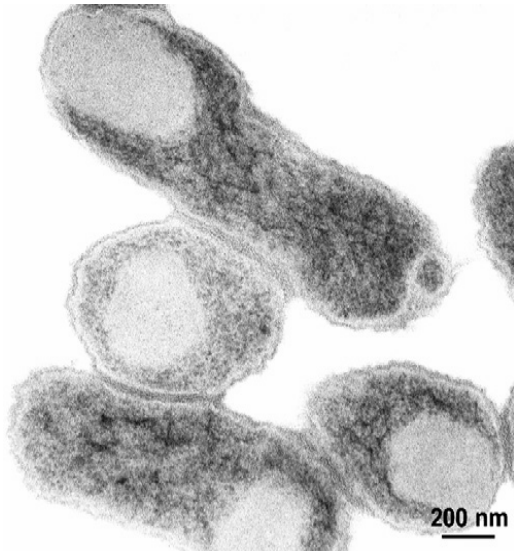


Abb. 2.9.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* mit cytosolischen inclusion bodies (Jungbauer und Kaar, 2007).

Überproduktion des Zielproteins kommt es nach Thomas *et al.* (1997) möglicherweise zu einer Limitierung an intrazellulären Chaperonen und Foldasen, welche *in vivo* komplexe Faltungsmechanismen für die korrekte Proteinfaltung übernehmen und damit die biologischen Eigenschaften vermitteln. Die Agglomeration wird durch hydrophobe und/oder ionische Wechselwirkungen der unvollständig gefalteten Translationsintermediate bewirkt (Mitraki und King, 1989).

Inclusion bodies (IBs) erscheinen als refraktile, amorphe, teilweise zylindrisch oder eiförmige, Granulate mit poröser und stark hydratisierter Struktur (Taylor *et al.*, 1986, Abb. 2.9.1). Die lineare Korrelation zwischen optischer Dichte und

Biotrockenmasse wird durch die Bildung von IBs stark beeinflusst. Die 0,5 - 1,3 µm großen Aggregate weisen gegenüber den meisten Zellbestandteilen eine höhere Dichte von 1,2 - 1,37 mg/ml auf (Taylor *et al.*, 1986; Margreiter *et al.*, 2008). Nach der Zelllyse lassen sich die IBs daher als angereicherte Proteinfraktion leicht durch Zentrifugation von den restlichen Zelltrümmern separieren.

Die Morphologie ist abhängig von der Temperatur sowie der zellulären Lage (Bowden *et al.*, 1991). IBs enthalten vorwiegend das rekombinante Protein (bis zu 99 %), wobei geringe Kontaminationen durch Chaperone (z.B. DnaK, GroEL), Plasmid-DNA/ribosomale RNA und Membranfragmente vorkommen können (Carrio und Villaverde, 2005; Margreiter *et al.*, 2008; Hartley und Kane, 1988). Membranöse Phospholipide können sich nach Zelllyse durch unspezifische Adsorption an der Oberfläche der Aggregate anlagern (Valax und Georgiou, 1993).

Nach Carrio *et al.* (2000) bildet sich eine zeitlich vom Faltungszustand abhängige heterogene IB-Struktur aus, welche eine innere Substruktur mit unterschiedlicher proteolytischer Erreichbarkeit beinhaltet. Bei der cytoplasmatischen Polypeptidaggregation einer β -Lactamase findet mit steigender Temperatur zunehmend eine β -faltblattinduzierte Proteinassoziation mit nativen Sekundärstrukturelementen statt, damit erhöht sich der Gehalt an β -Faltblatt zu helikalen Strukturen (Przybycien *et al.*, 1993; Georgiou und Valax, 1996). Native Sekundärstrukturen des Polypeptides können in den IBs erhalten sein (Singh und Panda, 2005). Worrall und Goss (1989) konnten für IBs einer überexprimierten

β -Galactosidase erstmals auch eine fest assoziierte Enzymaktivität korrekt gefalteter Proteinbestandteile nachweisen. Die *in vivo* Ausbildung poröser IB-Strukturen umfasst einen zeitlich von vielen Parametern abhängigen hochdynamischen Prozess, bestehend aus Proteinfreisetzung und -ausfällung. Damit kann sich im Aggregatkern im Gegensatz zu den Oberflächenschichten viel katalytisch aktives Protein anreichern (Garcia-Fruitos *et al.*, 2007). In IBs eingebettete Proteine können sehr effizient enzymespezifische Reaktionen katalysieren (Garcia-Fruitos *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011).

Die Bildung von Proteinaggregaten ist abhängig von den äußeren Bedingungen, wie der Temperatur, Ionenstärke, pH, Proteinkonzentration und die Gegenwart denaturierender Agenzien (Calamai *et al.*, 2005). Strandberg und Enfors (1991) stellen für das Absinken des pH-Wertes in Batchkultur (ohne pH-Regelung) verstärkt Proteinaggregation fest.

Die Co-Expression von Chaperonen und anderen Faltungsmodulatoren analog zur Expression des rekombinanten Gens führt zu einer Reduzierung der IB-Bildung zugunsten löslicher Proteinanteile (Ventura und Villaverde, 2006). Ein alternativer Weg zur Gewinnung quantitativ ausreichender Mengen an löslichem Protein ist die Rückfaltung von unlöslichem Protein aus IBs von *Escherichia coli* (Willis *et al.*, 2005).

Bei der Enzymproduktion kann das Vorhandensein von IBs große Vorteile beinhalten:

- hohe Konzentration an rekombinantem Protein
- geringe Verunreinigungen durch Co-Präzipitation
- Resistenz gegenüber proteolytischer Degradation

Die Präparation der IBs ermöglicht durch die Behandlung mit Detergentien und niedrigen Konzentrationen chaotroper Agenzien die Entfernung unspezifischer Zellfragmente, so dass für das Zielprotein eine Reinheit von mehr als 95 % erreicht werden kann (Singh und Panda, 2005). Gerade bei monomeren Enzymen ohne Disulfidbrücken hängt die Ausbeute bei der Rückfaltung maßgeblich von der IB Präparation und der Solubilisierung ab.

2.9.3 Solubilisierung und Methoden der Proteinerückfaltung

Zur Renaturierung katalytisch aktiver Enzyme ist es erforderlich, die Polypeptide der aufgereinigten inclusion bodies zunächst mit hochkonzentrierten chaotropen Salzlösungen (z.B. 6 - 8 M Harnstoff) oder Detergenzien (z.B. SDS) in Lösung zu bringen. Die Wechselwirkungen der Aggregatstruktur und der teilweise vorhandenen Sekundärstruktur werden durch die Solubilisierung aufgelöst, so dass die Polypeptidstränge in vollständig denaturierter Form vorliegen und hydrophobe Aminosäureabschnitte freigelegt werden.

Die Rückfaltung in die native Enzymkonfiguration steht in Konkurrenz zu Fehlfaltungen und Aggregation. Wenn hydrophobe Sequenzen nicht vollständig exponiert vorliegen, neigen die Zwischenprodukte während des Rückfaltungsprozesses zur Aggregation (Singh und Panda, 2005). Eine Optimierung der Harnstoffkonzentration und des pHs führte in Studien von Singh *et al.* (2008) unter milden Solubilisierungsbedingungen (2 M Harnstoff) mit steigender Alkalizität zu signifikant höheren Ausbeuten an aktivem Enzym.

Bei der *in vitro* Renaturierung des Proteins werden die denaturierenden Bedingungen möglichst langsam reduziert, um die sukzessive Ausbildung der nativen intramolekularen Wechselwirkungen für die enzymatische Sekundär- und Tertiärstruktur zu unterstützen und unerwünschte intermolekulare Wechselwirkungen zu unterdrücken. *In silico* Faltungsmodelle verlaufen nach Dobson (2003) über eine Reihe von Übergangszuständen (Sattelpunkte) bis hin zu einem thermodynamisch stabilen Zustand niedrigster Energie, welcher mit den nativen Wechselwirkungen sowie der Kontakthäufigkeit der AS-Reste korreliert. Die Hydrophobizität und Ladungsstärke der Aminosäurereste in der Polypeptidkette kann in Abhängigkeit des umgebenden Milieus zur schlagartigen Ausbildung solch kompakter Strukturen führen. Unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen von entfalteten Polypeptidketten sowie Interaktionen von partiell strukturierten Faltungsintermediaten vermitteln die Aggregatbildung (Rudolph und Lilie, 1996). Besonders bei hohen Proteinkonzentrationen neigen die Polypeptidketten zur Aggregation und mindern damit die resultierenden Ausbeuten an katalytisch aktivem Enzym.

Die intramolekulare Rückfaltung zur nativen Konformation ist eine Reaktion erster Ordnung, welche konzentrationsabhängig mit den intermolekularen Wechselwirkungen der Peptidketten, einer Reaktion höherer Ordnung, konkurriert (Jungbauer und Kaar, 2007; Rudolph und Lilie, 1996; Kiefhaber *et al.*, 1991; Zettlmeissl *et al.*, 1979). Hydrophobe Aggregation wird bei niedrigen Faltungsgeschwindigkeiten vermindert, so dass niedrige Temperaturen bis 15 °C zur Renaturierung eines Enzyms empfohlen werden (Vallejo und Rinas, 2004).

Es gibt keine universelle Methode zur Rückfaltung von Proteinen, da die Renaturierung ein komplexer proteinspezifischer Vorgang ist (Middelberg, 2002). Diverse *in vitro* Rückfaltungsmethoden sind etabliert:

- **Verdünnung:** Chaotrop und Protein werden durch schrittweise oder kontinuierliche Zugabe eines Rückfaltungspuffers verdünnt, was intermolekulare Wechselwirkungen minimiert. In diesem schnellen Verfahren werden im Allgemeinen Proteinkonzentration von 10 - 100 µg/ml gewonnen (Jungbauer und Kaar, 2007). Die Ausbeuten sind abhängig von den Eigenschaften des Puffers, welcher in großen Mengen eingesetzt werden muss.
- **Dialyse:** Bei geringen Ausgangskonzentrationen und/oder der Notwendigkeit, den Puffer auszuwechseln, wird bei konstantem Volumen der schrittweise bzw. kontinuierliche Austausch über eine semipermeable Membran ermöglicht (Tsumoto *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2011). Der langsame Pufferaustausch kann die Aggregation der Proteinfaltungsintermediate begünstigen und adsorptive Effekte der Membran mindern die Ausbeute (Leong und Middelberg, 2006).

- **Diafiltration:** Über eine Ultrafiltrationsmembran wird der Pufferaustausch ermöglicht. Die treibende Kraft besteht in der transmembranen, hydrodynamischen Druckdifferenz, welche zu einem diffusiven und konvektiven Stofftransport führt (Chmiel, 2011). Jedoch können ungefaltete Polypeptide teilweise die Membran passieren und ein Fouling die Membranporen verstopfen, was die Rückfaltungsausbeute deutlich beeinträchtigt (Li *et al.*, 2004).
- **Chromatographie:** Die Trennprinzipien der Chromatographie werden genutzt, um mit reversiblen Wechselwirkungen zur Matrix eine räumliche Separation und damit eine Reduktion der intermolekularen Wechselwirkungen der Peptidmonomere zu gewährleisten.
 - Die **Größenausschlusschromatographie (SEC)** gestattet eine Renaturierung in die native Konformation während der Elution mit Rückfaltungspuffer. Das Trennprinzip beruht auf dem unterschiedlichen hydrodynamischen Volumen von Molekülen und damit auf unterschiedlicher Diffusionszugänglichkeit in einer hochporösen, polymeren Matrix. Bei der Rückfaltung wird zudem eine Konformationsfraktionierung ermöglicht, da agglomerierte Proteine und niedermolekulare Substanzen voneinander separiert werden können (Li *et al.*, 2004).
 - Die **Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)** muss für die Rückfaltung individuell auf das zu trennende Protein abgestimmt sein, da besonders die Ladungsstärke und der pH einen großen Einfluss auf die Trenn- und Renaturierungsleistung beinhalten. Die ladungsbezogene Trennung erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen zu den geladenen funktionellen Gruppen einer polymeren Matrix. Der Einsatz von Gradienten bei pH, Ionenstärke und Ionenkonzentration bestimmt das Elutionsverhalten.
 - Die **Affinitätschromatographie** (z.B. Strep-Tag, His-Tag oder Intein-Tag) kann bei rekombinanten Fusionsproteinen durch reversible Immobilisierung an einen spezifisch bindenden Träger eine effiziente Aufarbeitung in einer Einschrittrückfaltung/-aufreinigung ermöglichen (Xu *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004). Chromatographische Methoden sind in der Anwendung sehr teuer und bei Proteinpräzipitation oder bei unspezifischen starken Bindungen zur Matrix anfällig für Verstopfungen.

Diese Systeme können zudem mit immobilisierten Faltungshelfern kombiniert werden, wie Chaperonen, Foldasen und Antikörpern oder auch mit zugesetzten Faltungsadditiven, wie L-Arginin, Kohlenhydrate, Ammoniumsulfat, Detergentien, „pseudoaffinen“ Polymeren, synthetischen TiO₂-Chaperonen (Altamirano *et al.*, 1999; Carlson und Yarmush, 1992; Li *et al.*, 2004; Tsumoto *et al.*, 2003 & 2004; Gautam *et al.*, 2012).

2.10 Aufreinigungsstrategien für Proteine

Die Anwendung von heterologen Expressionssystemen bieten bereits bei der Kultivierung durch hohe Zielparteinkonzentration einen direkten Bezug zur weiteren Aufarbeitung. Eine Vielzahl an Techniken und Methoden zur Separation und Aufreinigung von Proteinen ist etabliert. Diese erzielen effizient und selektiv im analytischen bzw. präparativen Maßstab hohe Biokatalysatorausbeuten. Die Komponenten eines Enzymextraktes können durch Techniken der Präzipitation, Extraktion, Filtration und Zentrifugation sowie durch elektrophoretische oder chromatographische Trennung sukzessiv fraktioniert und konzentriert werden.

In dieser Arbeit werden eine Reihe von chromatografischen Säulenmaterialien zur Proteinaufbereitung eingesetzt. Die grundlegenden Prinzipien der angewendeten Ionen-, Gel- und Affinitätschromatographie sowie schonender Membranseparationsverfahren werden im Kapitel 2.9.3 zu Methoden der Proteinrückfaltung erläutert.

2.11 Immobilisierung

Der technische Einsatz von Biokatalysatoren erfordert eine hohe Stabilität hinsichtlich der Lagerung und Prozessführung, eine leichte Handhabung bzw. ein gutes Rückhaltevermögen sowie die Möglichkeit zur Wiederverwendung. Feste Trägerpartikel dienen als Bindungs- oder Einschlussmatrix und bieten eine anwendungsorientierte Methode zur Realisierung eines einfachen, heterogenen (mehrphasigen) Katalysatorsystems. Die Immobilisierung schränkt die Beweglichkeit der Biokatalysatoren ein, so dass ein wiederholter oder kontinuierlicher Einsatz möglich wird (Hartmeier, 1985; Buchholz und Kasche, 1997). Im Festbett- oder Wirbelschichtverfahren kann durch einfache Feststoffrückhaltung eine kontinuierliche Prozessführung umgesetzt werden. Multiple Immobilisierungsverknüpfungen an der unflexiblen Matrix erhöhen zudem die Stabilität der tertiären Konformation gegenüber destabilisierenden Bedingungen (Hitze, organische Lösungsmittel, extreme pH-Werte) (Mateo *et al.*, 2007). Aggregation, unspezifische Adhäsion, alterungsbedingte Degradation sowie mechanische Beanspruchung durch Scherkräfte werden vermindert. Die Reaktion kann mit hohen Raum-Zeit-Ausbeuten unter produktschonenden, physiologischen Bedingungen in einem wässrigen System durchgeführt werden. Zudem ist auch der Einsatz von definierten Multienzymsystemen sowie eine chemoenzymatische Reaktionsführung möglich. Ein optimales Immobilisierungsverfahren ist individuell von den enzymatischen Charakteristika abhängig. Eine maßgeschneiderte Methode mit prozessbegünstigenden Eigenschaften zur Steuerung von Aktivität und Stabilität muss meist empirisch ermittelt werden. Die Grundverfahren zur Immobilisierung (Abb. 2.11.1) vermischen sich in der Literatur oftmals und werden anwendungsspezifisch modifiziert.

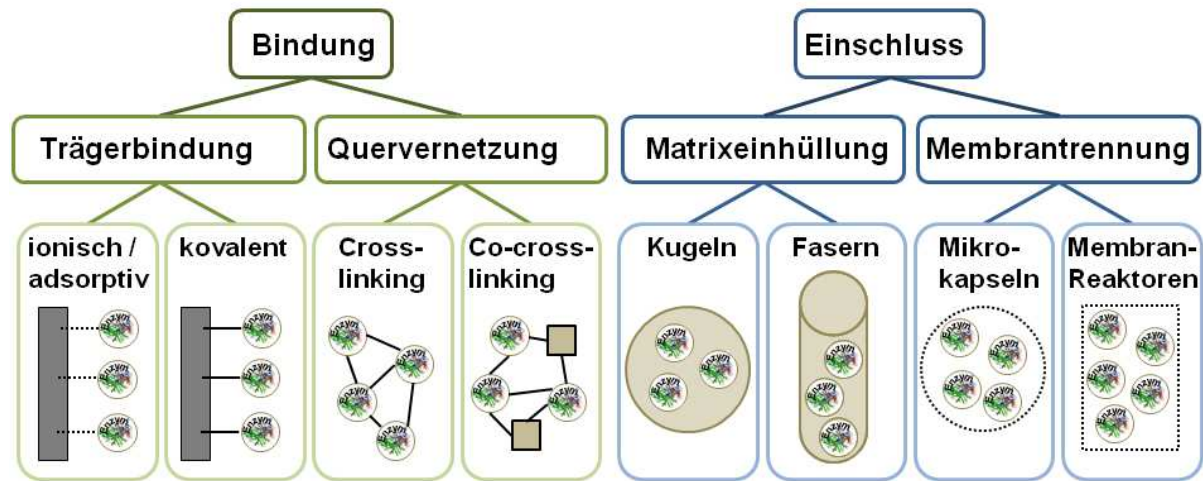


Abb. 2.11.1: Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren (Hartmeier, 1986).

Die grundlegende Funktion der Enzymimmobilisierung wird bestimmt durch die Eigenschaften des Trägermaterials (Oberfläche, Struktur, Art und Stärke der Wechselwirkungen), den Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Puffermedium) und dem Enzym selbst (Reinheit, strukturelle und katalytische Eigenschaften) (Cao, 2005). Die Wahl der Immobilisierungsmethode beeinflusst bei der Anwendung sowohl die katalytischen Eigenschaften (Produktivität, Raum-Zeit-Ausbeute, Stabilität, Selektivität) als auch die Prozesseigenschaften (Abtrennung, Prozesskontrolle, Down-Stream-Aufarbeitung). Die Stabilität eines verkapselten Enzymes kann sich um das 50 - 100-fache zum freien Enzym erhöhen (Cao, 2005).

Meist beträgt die Masse des Biokatalysators < 10 % der Gesamtmasse des Immobilisates, welche 10 - 20 % des gesamten Reaktorvolumens beansprucht (Cao, 2005). Gerade bei der Entwicklung technischer Anwendungen ist die maximal erreichbare volumetrische Aktivität (U/ml) entscheidend für die Ökonomie des Gesamtprozesses, da die Produktivität sowie Raum-Zeit-Ausbeute optimiert werden. Die kleinsten Partikelgrößen (< 10 µm) werden derzeit von sog. CLEAs (carrier-bound cross-linked enzyme aggregates) erreicht und bieten damit ein Maximum bezüglich der Raum-Zeit-Ausbeuten.

Die Mikroumgebung muss auf die Bindungsfunktionalitäten bei gleichzeitiger Erhaltung struktureller und funktioneller Integrität des Biokatalysators abgestimmt werden. Die Aufrechterhaltung der nativen Katalysatorfunktionalität kann aufgrund unspezifischer Oberflächenchemie bzw. Mikroumgebungen, sterischen Behinderungen, bindungsbedingter Konformationsänderung oder instabilen Verbindungen beeinträchtigt werden und damit zu starker Verminderung der Aktivität, Stabilität und Selektivität führen (Chibata *et al.*, 1986; Tardioli *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2007). Kinetische Behinderungen durch die Immobilisierung bewirken zumeist eine Reduktion der Substrataffinität, welche sich durch eine Erhöhung des K_M und Senkung des k_{cat} bemerkbar macht (Oh und Kim, 2000).

Die Konstruktion einer definierten stabilen Mikroumgebung kann bei kovalenter Vernetzung durch Absättigung der freien funktionellen Gruppen durch monomere oder polymere (Di-)Amin-Komponenten stattfinden (Mateo *et al.*, 2007). Die Oberfläche von frei

beweglichen Enzymen ist meist reich an hydrophilen, polaren Aminosäureseitenketten (Serin, Threonin, etc.). Eine Hydrophilisierung der Mikroumgebung kann näherungsweise physiologische Milieubedingungen schaffen und daher durch Co-Immobilisierung mit hydrophilen Makromolekülen (z.B. BSA) bzw. Spacern stabilisierend wirken.

2.11.1 Diffusiver Stofftransport bei immobilisierten Biokatalysatoren

Der diffusive Stofftransport kann bei immobilisierten Biokatalysatoren stark limitiert sein und zur Aktivitätsminderung führen. Die Reaktionsgeschwindigkeit von immobilisiertem Enzym wird von den konformalen Aktivitätsverlusten und von der Zugänglichkeit am Träger bzw. in der Porenstruktur geprägt. Bei diesen heterogenen Reaktionssystemen können Transport- bzw. Ausgleichsvorgänge zudem die Reaktionsgeschwindigkeit mindern. Gerade bei kleinen Porengrößen bzw. Maschenweiten können Diffusionslimitierungen auftreten, welche den Zugang von Substrat und den Austritt des Produktes beeinträchtigen.

Bei einem porösen Träger wird der Stofftransport zunächst durch Konvektion zur Grenzschicht bestimmt. Durch Diffusion werden die Stoffe beim externen Stofftransport durch die Grenzschicht zum Träger gebracht und durch die Porendiffusion beim internen Stofftransport innerhalb der porösen Matrix zum Biokatalysator. Schließlich kann die Diffusion in Abhängigkeit von Ort und Zeit durch das 2. Ficksche Gesetz mathematisch als parabolische Differentialgleichung beschrieben werden (Gleichung 2.14). Eine Berechnung dieses instationären Zustandes kann abhängig von den Anfangs- und Randbedingungen numerisch genähert werden.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \nabla \cdot (D \nabla c) \quad \text{mit } \nabla = \frac{\partial f}{\partial x} + \frac{\partial f}{\partial y} + \frac{\partial f}{\partial z} \quad (2.14)$$

Die Diffusion ist durch die Permeabilität des dreidimensionalen Körpers festgelegt, bei der die Porendiffusion in einem sphärischen Feststoffpartikel für eine Reaktion erster Ordnung makrokinetisch durch den Thiele-Modul (Gleichung 2.15) beschrieben werden kann.

$$\Phi = \frac{d_p}{6} \sqrt{\frac{v_{\max \text{ frei}}}{K_m \cdot D_{\text{eff}}}} \quad (2.15)$$

$$D_{\text{eff}} = \frac{D_0 \cdot \epsilon_p \cdot \delta}{\tau} = \text{effektiver Diffusionskoeffizient [m}^2/\text{s]} \quad (2.15.1)$$

Φ : Thiele-Modul [-]; d_p : Partikeldurchmesser [m]; v_{\max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit [M/s];

K_M : Michaelis-Konstante [M/s], D_0 : Diffusionskoeffizient [m²/s]; ϵ_p : Partikel-Porosität [-];

δ : Konstriktivität [-]; τ : Tortuosität [-]

Der effektive Diffusionskoeffizient beschreibt nach Weissberg (1963) die resultierende Diffusion in Abhängigkeit der zugänglichen Porosität, der Gewundenheit (Tortuosität) und des Widerstandes (Konstriktivität) im gesamten Porenraum poröser Medien. Der Thiele-Modul als dimensionslose Kennzahl beschreibt bei heterogenen Katalysatorsystemen das Verhältnis von Reaktions- zu Diffusionsgeschwindigkeit.

Der Porennutzungsgrad η bietet bei Stofftransportlimitierungen ein Effektivitätsmaß für die porendiffusionsbedingte Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Für einen kugelförmigen Partikel ergibt sich daher Gleichung 2.16.

$$\eta = \frac{v_{\text{eff}}}{v_{\text{frei}}} = \frac{3}{\Phi} \left(\frac{1}{\tanh \Phi} - \frac{1}{\Phi} \right) \quad (2.16)$$

η : Porennutzungsgrad [-]; $v_{\text{frei}} / v_{\text{eff}}$: Reaktionsgeschwindigkeit gelöstes / immobilisiertes Enzym [M/s]

Die Enzymbeladung ist abhängig von der Porengröße sowie der zugänglichen Oberfläche des Trägermaterials (Blanco, 2004). Im Allgemeinen liegt der Nutzungsgrad zwischen der spezifischen Oberfläche ($\sim 200 \text{ m}^2/\text{g}$) und der Porengröße ($\sim 100 \text{ nm}$) zwischen 0,1 und 0,2. Bei logarithmischer Auftragung von η über Φ ergibt sich für Werte von $\log \Phi > 3$ durch $\tanh \approx 1$ eine ausgeprägte Stofftransportlimitierung mit $\eta \approx 1/\Phi$. Eine Zunahme der Oberfläche korreliert mit der Abnahme von Porengröße und folglich auch der Zugänglichkeit der Reaktanden (Protein/Substrat/Produkt). Der technische Arbeitsbereich wird in Bezug auf Porennutzungsgrad und Thiele-Modul optimiert, so dass die effiziente räumliche Nutzung des Katalysators bei maximal möglichem Stofftransport realisiert wird.

Nach Weisz und Prater (1954) kann durch Vernachlässigung der Reaktionsordnung, der Katalysatorgeometrie und der Filmdiffusion vereinfachend das Weisz-Modul mit $\psi = \Phi^2 \eta$ definiert werden, welches den geschwindigkeitslimitierenden Schritt bestimmt (Porendiffusion: $\psi > 1$, Reaktion: $\psi < 1$).

2.11.2 Matriceinschluss

Der Einschluss des Biokatalysators in eine polymere Matrix bietet eine einfache und unter milden Reaktionsbedingungen durchführbare Immobilisierungsmethode, welche aufgrund der porösen Struktur gute Stofftransporteigenschaften aufweist. Eine disperse Lösung aus Enzym und dem monomeren Precursor wird zu einer mikroporösen hydrophilen Matrix polymerisiert, welche den schnellen diffusiven Austausch von Substrat/Produkt bei gleichzeitiger Rückhaltung des Katalysators gewährleistet. Hervorragende Biokompatibilität wird durch den Einschluss in natürliche Hydrogelpolymere gewährleistet, welche etwa aus Alginat, Chitosan (ionotrope Gelbildung) oder Agarose, κ -Carrageen, Cholesterin-Pullulan-Nanogel (Präzipitation) bestehen (Fang *et al.*, 2011). Die Vernetzung von Matrixmaterialien kann durch Strahlung (sichtbares oder UV-Licht, Röntgen- oder γ -Strahlung), elektrochemisch oder chemisch erfolgen (ionische Vernetzung, Polymerisation, Polykondensation oder Polyaddition) (Wollenberger *et al.*, 2012). Auch der einfache Einschluss mit polymerisierenden synthetischen Agenzien wie Polyacrylamid wird häufig eingesetzt, wobei die Radikalbildung das Enzym schädigen kann.

Eine zusätzliche Quervernetzung der proteinogenen Amin- bzw. Hydroxylgruppen mit bifunktionellen Agentien wie Glutardialdehyd verstärkt gerade bei kleineren Makromolekülen das Rückhaltevermögen in der Matrix, sowie die mechanische Langzeitstabilität gegenüber

dem Quellverhalten in wässrigen Medien. Die Wahl des Polymers und des stöchiometrischen Verhältnis zum Quervernetzer ermöglicht die Einstellung der mechanischen Eigenschaften und der resultierenden Maschenweite (ca. 8 - 17 nm bei 1 - 3 % Alginat; ca. 48 - 100 nm bei 1 - 2 % Agarose; ca. 80 - 150 nm bei 2 % Chitosan/Xanthan (Erhardt, 2008). Nach Smidsrød (1974) zeigt Ca-Alginat mit 5 - 200 nm eine äußerst breite Verteilung beim Porendurchmesser. Dabei ist die Porengröße an der Oberfläche der Perlen kleiner als im Perleninneren (Smidsrød und Skjåk-Bræk, 1990; Martinsen *et al.*, 1992).

Für den Matriceinschluss der recFTF wird Alginat verwendet. Im Allgemeinen besteht dieses aus linearen Polysaccharidketten, welche aus Braunalgen gewonnen werden. Die α -L-Guluronsäure- und β -D-Mannuronsäure-Einheiten sind dabei in unterschiedlichem Verhältnis 1,4-glycosidisch verknüpft.

2.11.3 Adsorption

Die Adsorption ist ein einfaches Verfahren zur Anreicherung eines Stoffes an einer Festkörperoberfläche. Die Art der Wechselwirkungen unterscheidet zum einen die Physisorption mit schwachen van-der-Waals, Dipol-induzierten oder apolaren Wechselwirkungen bei Bindungskräften < 40 kJ/mol und zum anderen die Chemisorption mit polaren, elektrostatischen oder Säure/Base Wechselwirkungen bei Bindungskräften > 40 kJ/mol. Durch die schwachen Bindungskräfte bleibt sowohl die natürliche Konformation als auch die Aktivität weitgehend erhalten.

Das Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption an einer Oberfläche wird durch Adsorptionsisothermen beschrieben, welche die gebundene Stoffmenge in Abhängigkeit der gelösten Stoffmenge darstellen. Die Adsorption/Desorption weist ein hysteretisches Gleichgewichtverhalten mit vielen Zustandsgrößen spezifischer Varianz auf.

Die Langmuir-Isotherme (Langmuir, 1932; 1933) kann eine maximale Beladung der Adsorbensoberfläche darstellen und ist das einfachste Adsorptionsmodell. Das Modell setzt voraus, dass die Adsorption reversibel in monomolekularer Schicht erfolgt, alle Adsorptionsplätze energetisch homogen und uniform sind und keine Interaktionen zwischen benachbarten Adsorptionsplätzen bzw. adsorbierten Teilchen stattfindet. Bei der Proteinadsorption nach Langmuir (Gleichung 2.17) wird die Bindungsaffinität zu den Adsorptionsplätzen durch den Langmuir-Koeffizienten K_L berücksichtigt.

$$q_i = \frac{q_{\max} \cdot K_L \cdot c_{eq}}{1 + K_L \cdot c_{eq}} \quad (2.17)$$

q_i : Beladung des Adsorbens [$g_{\text{Protein}}/g_{\text{Adsorbens}}$]; q_{\max} : maximale Beladung des Adsorbens (monomolekulare Schicht) [$g_{\text{Protein}}/g_{\text{Adsorbens}}$]; K_L : Langmuir-Adsorptionskoeffizient [-]; c_{eq} : Konzentration des Enzyms in Lösung [mg/ml].

Zahlreiche Modelle wie die BET-Isotherme (Brunauer *et al.*, 1938), die Frumkin-Isotherme (Frumkin, 1925) oder die Temkin-Isotherme (Temkin, 1941) wurden empirisch vom Langmuir-Modell abgeleitet. Dabei werden nicht-lineare Zusammenhänge in Bezug auf

Mehrschichtadsorption, Wechselwirkungen in der Adsorptionsschicht in Abhängigkeit von der Adsorptionsfähigkeit und die Verschiedenartigkeit der Adsorptionsplätze berücksichtigt (Eiswirth und Schwankner, 1989; Dörfler, 2002).

Eine Desorption des Biokatalysators kann infolge einer Änderung des pH oder der Ionenstärke eintreten. Zu starke adsorptive Wechselwirkungen können auf der planaren Oberfläche eines Trägers zu einer Spreitung bzw. Deformation des Enzyms führen (Haupt, 2005).

In Abwandlung zu Langmuir wird bei der Freundlich-Isotherme (Gleichung 2.18; Freundlich, 1907) die Sättigung unter Berücksichtigung der energetischen Heterogenität der Adsorbensoberfläche nicht erreicht.

$$\mathbf{q}_i = \mathbf{K}_F \cdot \mathbf{c}_{eq}^{\frac{1}{m}} \quad (2.18)$$

K_F : Freundlich-Koeffizient [-]; c_{eq} : Proteinkonzentration in Lösung [g/l]; m : Freundlich-Exponent [-]

2.11.4 Adsorption an Bentonit

Bentonit ist ein aus der Verwitterung von vulkanischer Asche hervorgegangenes heterogenes Tonmineralgemisch. Die Zusammensetzung variiert je nach Lagerstätte. Das Tonmineral Montmorillonit ist mit 60 - 90 % der Hauptbestandteil, neben Anteilen von Begleitmineralien wie kristalline Kieselsäure bis 20 % (Quarz, Cristobalit, Tridymit), Kaolin, Glimmer, Kalzit, Dolomit und Feldspat (Pohl, 1992). Aus der Zusammensetzung des Tonminerals Montmorillonit leitet sich die Summenformel $\text{Al}_{1,6} \text{Mg}_{0,33} [(\text{OH})_2 \text{Si}_4 \text{O}_{10}] \cdot \text{Na}_{0,33} (\text{H}_2\text{O})_4$ ab.

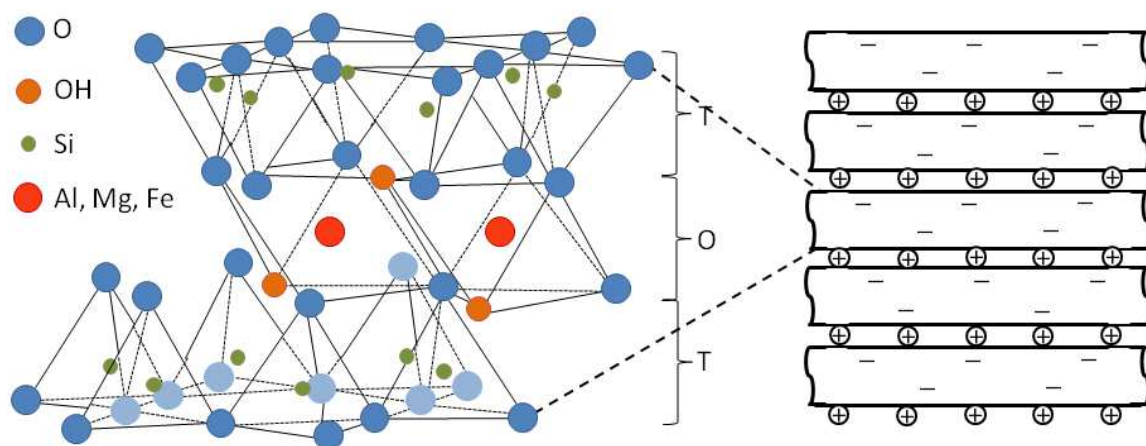


Abb. 2.11.2: räumliche Darstellung der Bentonit-Schichtstruktur (T = Tetraederschicht, O = Oktaederschicht) (GeoDataZone, 2013).

Das Montmorillonit wird den Dreischichttonmineralien (Smektite) zugeordnet. Montmorillonit besteht aus Aluminiumhydrosilikat, welches aus der mehrfachen Abfolge einer oktaedrischen Aluminiumoxidschicht zwischen zwei tetraedrischen Siliziumdioxidschichten kristalline

Strukturen ausbildet. Durch die reversible Einlagerung von Wassermolekülen ist der Schichtabstand des Kristallgefüges flexibel, so dass Bentonit ein hohes Quellverhalten aufweist. Größe und Ladung der interkristallin eingelagerten und austauschbaren Kationen bestimmen das Quellverhalten und die adsorbierenden Eigenschaften des Bentonits.

Die heterogene Zusammensetzung des Bentonits erfordert die Konditionierung zu einer homogenen Adsorbermatrix, welche die Entfernung enthaltener Huminsäuren als auch den Kationenaustausch gegen Natriumionen beinhaltet.

Na⁺ assoziiertes Bentonit weist in wässrigen Lösungen gelartiges Quellverhalten auf, welches zudem in Suspension beständige Eigenschaften aufweist (Robinson, 1962). Bentonit weist nach Bajpai und Sachdeva (2002) eine sehr große spezifische Oberfläche von 400 m²/g bei einem mittleren Partikeldurchmesser von 40 µm auf.

2.11.5 Adsorption an Hydroxylapatit

Hydroxylapatit besteht aus mineralischem Calciumphosphat [(Ca₅(PO₄)₃OH)₂] in hexagonaler Kristallstruktur (Kawasaki *et al.*, 1985).

Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Hydroxylapatit sind sehr komplex und bisher nicht eindeutig geklärt. Es bilden sich vorwiegend unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminogruppen und negativ geladenen Phosphat- und Hydroxylresten aus, während negativ geladene Carboxylreste abgestoßen bzw. durch Calciumionen komplexiert werden (Kaldenhoff und Richter, 2003, Abb. 2.11.3). Das preisgünstige keramische Material wird daher oftmals zur proteinchromatographischen Trennung eingesetzt.

Saure Proteine, wie Fructosyltransferasen, binden hauptsächlich durch die exponierten Carboxylgruppen am Hydroxylapatit. Die natürliche Funktion der FTFs wird zudem auch durch die gebildeten Polyfructane unterstützt, welche besonders für die Anheftung von Bakterien und Enzymen am Zahnschmelz verantwortlich sind (Rozen *et al.*, 2001).

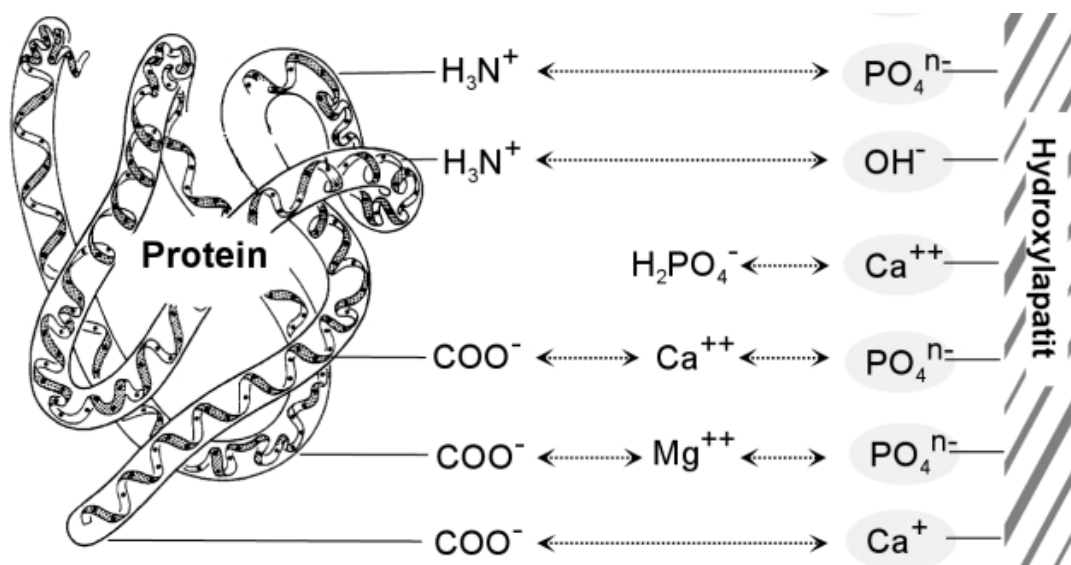


Abb. 2.11.3: elektrostatische Wechselwirkungen von Hydroxylapatit nach Gey (2008)

Die Immobilisierung kann aufgrund von Konformationsänderungen funktionelle Unterschiede im Vergleich zur freien FTF aufweisen (Bronshteyn und Steinberg, 2002). Für Hydroxylapatit wird bei einem mittleren Partikeldurchmesser von 80 μm eine spezifische Oberfläche von 50 m^2/g angegeben (Bronshteyn und Steinberg, 2002).

2.11.6 Kovalente Anbindung an Eupergit C

Eupergit C ist ein perlförmiges Methacrylpolymer mit 50 - 250 μm Durchmesser, einem mittleren Porendurchmesser von 100 nm bei 53 m^3/g spezifischer Oberfläche. Enzyme werden über Aminogruppen teilweise mehrfach kovalent an die Oxirangruppen des Trägermaterials gebunden.

3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll die biokatalytische Synthese von Fructooligosacchariden durch eine Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 und eine β -Fructofuranosidase aus *Aspergillus niger* AB1.13 untersucht werden. Die Enzymkatalyse bietet ein einfaches und kostengünstiges Verfahren für die stereo- und regioselektive Umsetzung von Saccharose zu hochwertigen Fructooligosacchariden.

Die Zielsetzung der Arbeit konzentriert sich auf folgende Bereiche:

- Die Kultivierung von *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 soll durch Anpassung der Kultivierungsparameter zu maximalen Aktivitätsausbeuten der homolog exprimierten Fructosyltransferase führen. Dazu wird das Expressionsverhalten zur Anreicherung des Enzyms bei der batchweisen Kultivierung untersucht. Zudem soll ein Verfahren zur Aufreinigung des extrazellulären Enzyms etabliert werden.
- Das *ftf*-Gen aus dem Wirtstamm soll identifiziert und das Protein durch rekombinante Expression im Produktionsstamm *Escherichia coli* angereichert werden. Die Ausbeute an aktivem Biokatalysator soll durch die Einstellung der Kultivierungsbedingungen optimiert werden.
- Für die rekombinante Fructosyltransferase soll zur Gewinnung reiner Proteinmengen ein geeignetes Aufreinigungsverfahren entwickelt werden.
- Durch die biochemische Charakterisierung nativen und rekombinanten Varianten sollten die kinetischen Parameter ermittelt werden. Die Fructosylierungsreaktion soll hinsichtlich maximaler Raum-Zeit-Ausbeuten zur Bildung von Saccharosederivaten untersucht werden.
- Für die Anforderungen des verfahrenstechnischen Einsatzes soll die Fructosyltransferase durch ein einfaches und kostengünstiges Verfahren immobilisiert werden. In wenigen Verfahrensschritten soll das Immobilisat gewonnen und in hoher Konzentration für die Synthesereaktionen zur Verfügung stehen.
- Die β -Fructofuranosidase soll enzymkinetisch charakterisiert werden und zur zielgerichteten Synthese von Fructooligosacchariden des Inulin-Typs aus Saccharosederivaten eingesetzt werden. Die entstandenen Produkte sollen isoliert und charakterisiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Gerätschaften und Material

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Controller: Liquid Chromatography Controller LCC-500 Plus

Detektor: Biotech UV-MII, Fa. Pharmacia

Pumpe: LKB Pump P-500, Fa. Pharmacia

Hauptsäule I-III: Resource Q (1 ml), Source 30Q (30 ml), CM-Sepharose (30 ml),
Fa. Pharmacia, Fa. Amersham Bioscience

Hauptsäule IV: Bio-Gel P-100 (~10 ml, var. Vol., MW 5000 - 100000), Bio-Rad

Fractionssammler: LKB Frac-100, Fa. Pharmacia

Schreiber: LKB REC 102, Fa. Pharmacia

High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC)

Basisgerät: Basic Chromatography Module, Modell CHB, Fa. Dionex

Detektor: Pulsed Amperometric Detector, Modell PAD-2, Fa. Dionex

Pumpe: Gradient Pump, Modell GPM-2, Fa. Dionex

Autosampler: Series 200 mit Tefzel Rheodyne-Ventil, Fa. Perkin Elmer

Vorsäule: CarboPac PA1, 4x50 mm, Fa. Dionex

Hauptsäule: CarboPac PA1, 4x250 mm, Fa. Dionex

Thermostat: Thermomix BU, Fa. Braun

Software: Clarity, Version 2.6.2.226

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Degaser: Modell Degasys 1210, Fa. Uniflows

Detektor: Brechungsindex-Detektor, Modell RI-101, Fa. Shodex

Pumpe: Modell LC-9A, Fa. Shimadzu

Autosampler: 816, Fa. Kauer

Vorsäule: Sugar SC-G, 4,6x10 mm, Fa. Shodex

Hauptsäule: Sugar SC-1011, 8x300 mm, Fa. Shodex

Thermostat: Thermasphere TS-130, Fa. Phenomenex

Software: Clarity, Version 2.6.2.226

Dokumentation der Gele und Dünnschichtchromatographie Platten

Quantitative Auswertung:

Scanner: GS-800 Calibrated Densitometer, Fa. Bio-Rad

Software: Quantity One Version 4.2.3, Fa. Bio-Rad

Qualitative Auswertung:

Scanner: Scanjet 5300C, Fa. Hewlett

pH-Messgeräte

pH-Messgerät I: Modell GHM3530, Fa. Greisinger

Temperaturfühler: PT100, Modell GTF 35, Fa. Greisinger

Standardelektrode: Model GE 100 BNC, Fa. Greisinger

pH-Messgerät II: Modell pH525, Fa. WTW

Fermentersysteme

Bioreaktor I: Biostat QB, Fa. Braun Biotech Int.

Bioreaktor II: Minifors, Fa. Infors HAT

Thermostat: Modell FP40, Fa. Julabo

Steuerungs-Software: Iris, Version 5.2

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Elektrophorese-Netzgerät: Power-phor-N, Fa. Anamed
mit Elektrophoresekammer Eco-Cell, Fa. Anamed

Elektrophorese-Netzgerät: PowerPac HC, Fa. Bio-Rad
mit Elektrophoresekammer Mini Protean Tetrasystem, Fa. Bio-Rad

Elektroblot

Fastblot Semi-Dry Blotter B44, Fa. Biometra
mit Elektrophorese-Netzgerät: PowerPac HV Power Supply, Fa. Bio-Rad

Querstromfiltration

Pumpe: Modell Masterflex L/S mit Pumpenkopf Easyload 7518, Fa. Cole Parmer

Querstromfiltrationskassette: Vivaflow 200

mit 30,000 und 100,000 MWCO Partikelausschlussgröße, Fa. Sartorius

Photometer

Photometer I: Spectrophotometer DU-65, Fa. Beckmann

Photometer II: Spectrophotometer 6315, Fa. Jenway

Photometer III: GENios, Fa. Tecan (96-Well-Platten)

Photometer IV: NanoDrop 2000, Fa. Thermo Scientific

Ultraschallaufschluss

Modell Sonoplus, Fa. Bandelin Electronics

Ultraschall-Sonotroden: MS 72 und MS 73, Fa. Bandelin Electronics

Zentrifugen

Tischzentrifuge: Minispin, Fa. Eppendorf

Festwinkelrotor: 5415 C, Fa. Eppendorf

Tischkühlzentrifuge: Fresco 21 mit Festwinkelrotor, Fa. Thermo Scientific

Untertischkühlzentrifuge I: Sorvall RC-5B, Fa. Du Pont Instruments

Festwinkelrotor: Jouan AM 50.14, Jouan BR4, Fa. Du Pont Instruments

Untertischkühlzentrifuge II: 5804R, Fa. Eppendorf

Festwinkelrotor: KL024, Fa. Eppendorf

Kühlzentrifuge: Avanti J-E, Fa. Beckmann Coulter

Festwinkelrotor I: JA-10, Fa. Beckmann Coulter

Festwinkelrotor II: JA-25.50, Fa. Beckmann Coulter

Reinstwasseranlage

Modell Milli-Q, Fa. Millipore

Modell Arium Basic, Fa. Sartorius Stedium Biotech

Schüttelinkubatoren

Modell HTMR-131 mit verschiedenen Aufsätzen, Fa. HLC

Modell MHR 23 mit Steuereinheit BT 03 und verschiedenen Aufsätzen, Fa. HLC

Modell Inkubator 1000 mit Schüttler Modell Titramax 1000, Fa. Heidolph

Zellkultivierung-Inkubator I: Modell 3032, Fa. GFL

Zellkultivierung-Inkubator II: Modell 3033, Fa. GFL

Sterilisation von Medien und Sterilwerkbank

Autoklav: Modell VE-150, Fa. Systec GmbH

Sterilwerkbank: Heraeus Laminair, Fa. Heraeus

4.2 Chemikalien und Enzyme

4.2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind kommerziell erhältlich und werden, soweit nicht anders angegeben, in einem Reinheitsgrad *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel De Haen (Seelze), Sigma (Deisenhofen).

4.2.2 Enzyme

Die Enzyme aus *Aspergillus niger* und *Bacillus subtilis* sind als GRAS (generally recognized as safe) von der amerikanischen "Food and Drug Administration" (FDA) zugelassen (Taylor und Richardson, 1979).

4.2.2.1 *SacB* aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

Die Exo-Fructosyltransferase SacB (EC 2.4.1.162, Brenda Enzym Datenbank) wird zunächst nativ aus dem Kulturüberstand der Kultivierung des Herkunftstammes *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 gewonnen. Das Enzym hat nach Erickson (2009) einen Durchmesser von etwa 5 nm.

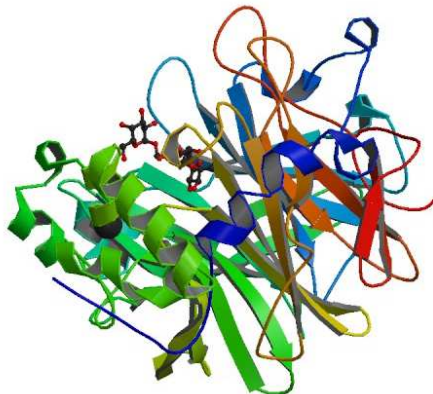


Abb. 4.2.1: 3D-Struktur Fructusyltransferase SacB aus *Bacillus subtilis* mit gebundenem Raffinosemolekül (Meng und Fütterer, 2008)

Die rekombinante Variante wird durch *Escherichia coli* BL21 hergestellt und kann mittels eines C-terminal angehängten Polyhistidin-Tags aufgereinigt werden.

```
MNIIKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFsecAKETNQKPYKETYGISHITRHDMLQIPEQQKNEKYQVPEFDSST
IKNISSAKGLDVWDSWPLQNADGTVANYHGYHIVFALAGDPKNADDTSIYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVFK
DSDKFDANDSILKDQTQEWSGSATFTSDGKIRLFYTFDFSGKHGKQTLTTAQVNVASDSSLNINGVEDYKS
IFDGDGKTYQNVQQFIDEGNYSSGDNHTLRDPHYVEDKGHKYLVFEANTGTEDGYQGEESLFNKAYYGKSTS
FFRQESQKLLQSDKKRTAELANGALGMIELNDDYTLKKVMKPLIASNTVTDEIERANVFKMNGKWYLF TDSR
GSKMTIDGITSNDIYMLGYVSNSTGPKPLNKTGLVLKMDLDPNDVTFTYSHFAVPQAKGNNVITSYMTN
RGFYADKQSTFAPSFLNIIKGKKTSSVVKDSILEQQQLTVNKLSpacerLEHHHHHHH
```

Abb. 4.2.2: AS-Sequenz der rec FTFHis (p24FTF) inkl. ^{sec}-Signalsequenz und ^{Spacer} mit His6- Tag
481 Aminosäuren, 54,036 kDa, pI 6,32

Die für die Immobilisierung umklonierte Variante enthält im Vergleich zum Vorgängerenzym keine Signalsequenz und besitzt einen C-terminal angehängten Streptavidin-Tag zur Aufreinigung.

Abb. 4.2.3: AS-Sequenz der recFTFStrep (pASK-IBA63bFTF) inkl. Spacer mit Strep-Tag 458 Aminosäuren, 51,617 kDa, pI 5,75, selten verwendete Codons durch Coplasmid pRARE abgedeckt, katalytische Triade (Asp59 - vorher Asp86, Asp220 - vorher Asp247, Glu315 - vorher Glu342)

```
MAKETNQKPYKETYGISHITRDMLQIPEQQKNEKYQVPEFDSSTIKNISSAKGLDVWDSWPLQNADGTVAN
YHGYHIVFALAGDPKNADDTSIYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVFKDSDKFDANDSILKDQTQEWSGSATFTS
DGKIRLFYTDFSGKHYGKQTLTTAQVNVASDSSLNINGVEDYKSIFDGDGKTYQNVQQFIDEGNYSSGDNH
TLRDPHYVEDKGHKYLVFEANTGTEDGYQGEESLFNKAYYGKSTSFFRQESQKLLQSDKKRTAELANGALGM
IELNDYTLKKVMKPLIASNTVTDEIERANVFKMNGKWYLF TDSRGSKMTIDGITSNDIYMLGYVSNLTGP
YKPLNKTGLVLKMDLDPNDVFTFYSHFAVPQAKGNNVVITSYMTNRGFYADKQSTFAPSFLNLNKGKTSVV
KDSILEQQQLTVNKLLESAWSHPQFEK
```

4.2.2.2 *Suc1* aus *Aspergillus niger* AB1.13

Die Klonierung und homologe Expression der β -Fructofuranosidase (Suc1) in dem Stamm *Aspergillus niger* AB1.13 wurde durch die Arbeitsgruppe Petra Dersch (Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig bzw. Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) durchgeführt.

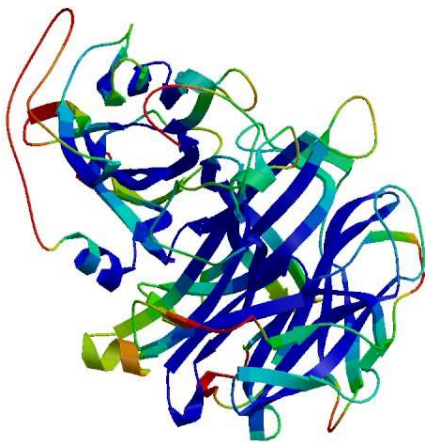


Abb. 4.2.4: 3D-Struktur nach SWISS-Mode (QMEAN4, Benkert *et al.*, 2008) *in silico* nach Sequenzvorlage der Fructosyltransferase aus *Aspergillus japonicus* (D191A, Chuankhayan *et al.*, 2010)

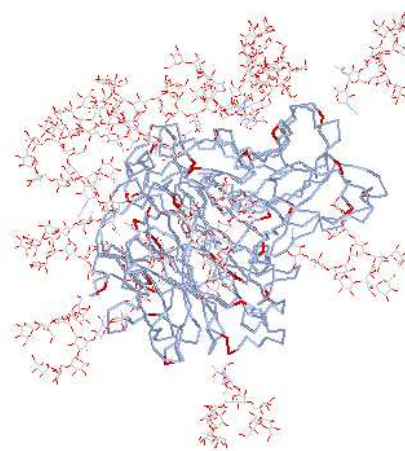


Abb. 4.2.5: 3D-Struktur nach GlyProt (Bohnelang und von der Lieth, 2005) *in silico* durch N-Glycosylierung der 14 möglichen Asn-X-Ser/Thr Sequons

Das Gen der Exo- β -Fructofuranosidase (Suc1, EC 3.2.1.26, Brenda Enzym Datenbank) wird bei *Aspergillus niger* AB1.13 durch Saccharoseinduktion exprimiert und die Suc1 wird nach der posttranslationalen Modifikation ins umgebende Medium sekretiert.

```

MKLQ TASVLLGSAAAASPSMQTRASVVIDYNVAPPNLSLTPNGSLFETWRPRAHVLPPNGQIGDPCLHYTDP
STGLFHVGF LHDGSGISSATDDLATYKDLNQGNQVIVPGGINDPVAVFDGSGVIPSGINGLPTLLYTSVSFL
PIHWSIPYTRGSETQSLAVSSDGGSNFTKLDQGPVIPGPPFAYNVTAFRDPYVFQNP TLD SLLH SKNNTWYT
VISGGLHGKGPAQFLYRQYDPDFQYWEFLGQWWHEPTNSTWGNGTWAGR WAFNFETGNVFS LDEYGYNPHGQ
IFSTIGTEGSDQPVVPQLTSIHDM LWVSCNVS RN GSVSFTPNMAGFLDWGFSSYAAAGK VLPSTSLPSTKSG
APDRFISYVWLSGDLFEQAEGFPTNQONWTG TLLLPRELRLVLYIPNVVDNALARESGASWQVSSDSSAGTV
ELQTLGISIARETKAALLSGTSFTESDRTLNSG GVV PFKRSPSEKFFVL SAQLSFPASARGSGLKSGFQILS
SELESTTVYYQFSNESIIVDRSNTSAAARTTDGIDSSAEAGKLRLFDVLNGGEQAIETLDTLTVVDNSVLEI
YANGRFALSTWVR

```

Abb. 4.2.6: AS-Sequenz der Suc1 aus *Aspergillus niger* mit 589 Aminosäuren ist deglycosyliert 63,634 kDa (pI 4,89) groß bzw. glycosyliert etwa 120 kDa; 14 Asn-X-Ser/Thr Sequons, welche N-glycosylierte Asparaginreste nach NetNGlyc 1.0 (Center of Biological Sequenceanalysis, Technische Universität Dänemark) enthalten können.

4.2.2.3 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	U/μL	Schnittstelle 5'→3'	Hersteller	Inkubation
<i>NdeI</i>	10	C↓ATAT G	Fermentas	37° / 1,0 h
<i>XhoI</i>	10	C↓TCGA G	Fermentas	37° / 1,0 h
<i>EcoRI</i>	10	G↓AATT C	Fermentas	37° / 1,0 h
<i>HindIII</i>	10	A↓AGCT T	Fermentas	37° / 1,0 h
<i>NcoI</i>	10	C↓CATG G	Fermentas	37° / 1,0 h

4.2.2.4 Enzyme für die Polymerase-Kettenreaktion

FTF p24: Als Polymerase wird die TITANIUM taq-Polymerase (Clonetech) verwendet.

4.2.3 Mikroorganismen und Plasmide

4.2.3.1 Mikroorganismen

Die Bakterienstämme *Escherichia coli* DH5-α und NEB 5-alpha werden für die Klonierung und Plasmidanreicherung verwendet. Die proteasedefizienten Bakterienstämme *Escherichia coli* BL21 (DE3) sowie Rosetta (DE3) werden für die Expression der rekombinanten Proteine eingesetzt. DE3 Stämme enthalten im *int* Gen des *Escherichia coli* Genoms eine inserierte Kopie des *lacIq*-Gens, den *lacUV5*-Promotor und das Gen für die T7-RNA-Polymerase aus dem lysogenen Bakteriophagen DE3. Die T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, welcher durch IPTG induzierbar ist. Aufgrund der hohen Spezifität zum T7-Promotor reichert sich im hohen Maße die m-RNA des transkribierten Zielgenes in der Zelle an. Innerhalb weniger Stunden kann die Konzentration des Zielproteins in Abhängigkeit von der codon usage einen Anteil von über 50 % des Gesamtproteins der Wirtszelle erreichen (Studier und Moffatt, 1986).

Der filamentöse, proteasedefiziente Stamm *Aspergillus niger* AB1.13 ist aufgrund einer Mutation des *pyrG*-Gens uridinauxotroph, welches durch die Zugabe des Ribonukleotids Uridin zur Kultivierung für die RNA-Synthese kompensiert wird. Das Gen *suc1* wurde von der Arbeitsgruppe Dersch isoliert und später über den rekombinanten Expressionsvektor pSKAn1015 (aus ANIp8) zurück in das Wirtsgenom kloniert. Unter der endogenen metabolischen Kontrolle des Pyruvatkinase Promotors *pkiA* wird *suc1* konstitutiv homolog exprimiert. In Gegenwart der C-Quelle Saccharose wird die extrazelluläre Sekretion der Suc1 deutlich stärker induziert als durch Glucose, Xylose und Maltose.

Tab. 4.2.1: Verwendete Mikroorganismen

Mikroorganismus	Genotyp	Quelle/Referenz
Prokaryotisch		
<i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	nativer Stamm	Cheetham <i>et al.</i> (1989) / Inst. für Technische Chemie, TU Braunschweig
<i>Escherichia coli</i> RRIΔM15	leu pro thi strA hsd r ⁻ m ⁻ lacZ ΔM15 F' lac I ^Q ZΔM15 pro ⁺	Rüther (1982) / Fa. X-Zyme
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B) λ(DE3)	(Studier und Moffatt, 1986) / Fa. Novagen
<i>Escherichia coli</i> NEB 5-alpha	fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 (Φ80 ΔlacZ M15) gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Fa. New England Biolabs
<i>Escherichia coli</i> Rosetta (DE3)	F ompT gal dcm hsdS _B (r _B ⁻ ,m _B ⁻) λ(DE3) pRARE(Cam ^r)	Fa. Novagen
Eukaryotisch		
<i>Aspergillus niger</i> AB1.13	prf cspA ⁻ pyrG ⁻	Mattern <i>et al.</i> (1992) / Inst. für Mikrobiologie, TU Braunschweig
<i>Aspergillus niger</i> SKANIp8	pKIA prf cspA ⁻ pyrG ⁺ amp ^r Negativkontrolle	Zuccaro <i>et al.</i> (2008) / Inst. für Mikrobiologie, TU Braunschweig
<i>Aspergillus niger</i> pSKAn1015	pKIA prf cspA ⁻ pyrG ⁺ amp ^r suc1 ⁺	Zuccaro <i>et al.</i> (2008) / Inst. für Mikrobiologie, TU Braunschweig

4.2.3.2 Plasmide

Tab. 4.2.2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Genotyp	Quelle/Referenz
Prokaryotisch		
pET-24+	kan ^r T7/lac-Promotor	Fa. Novagen
p24FTF	kan ^r T7/lac-Promotor - Expressionsvektor sacB ⁺ (N-term. Signalsequenz, C-term. His-Tag)	Fa. X-Zyme
pASK-IBA63b+	amp ^r tet-Repressor	Fa. IBA
pASK-IBA63b+FTF	amp ^r tet-Repressor - Expressionsvektor sacB ⁺ (ohne Signalsequenz, C-term. Strep-Tag II)	
pRARE	cam ^r , p15a Replicon - codiert t-RNA für seltene <i>E. coli</i> Codons: AGG/AGA (Arginin); AUA (Isoleucin); CUA (Leucin); CCC (Prolin); GGA (Glycin)) (pACYC184)	Fa. Novagen
Eukaryotisch		
ANIp8	<i>pKIA pyrG⁺ amp^r</i>	Fa. Novagen
pSKAn1015	<i>pKIA pyrG⁺ amp^r suc1⁺</i>	Zuccaro <i>et al.</i> (2008) / Inst. für Mikrobiologie, TU Braunschweig

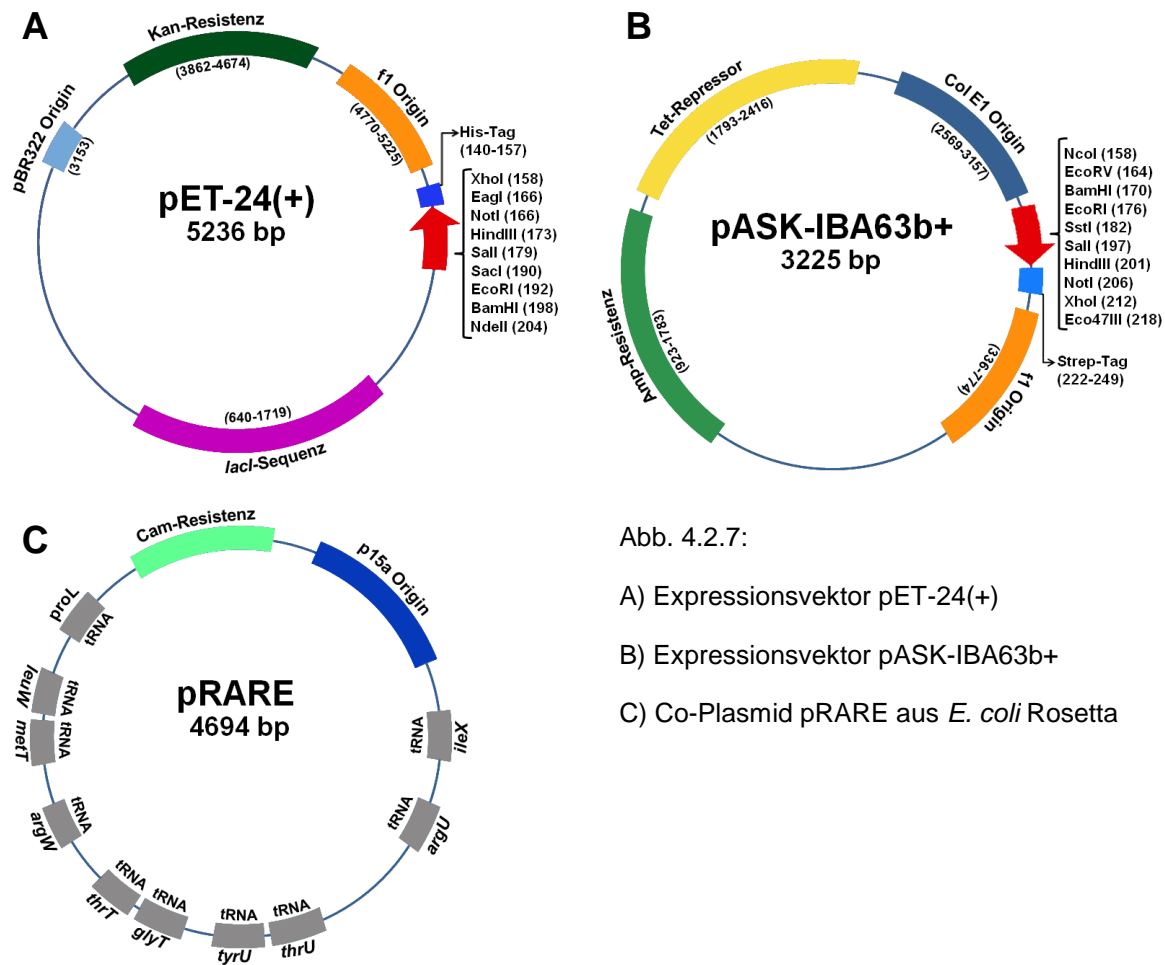


Abb. 4.2.7:

- A) Expressionsvektor pET-24(+)
 B) Expressionsvektor pASK-IBA63b+
 C) Co-Plasmid pRARE aus *E. coli* Rosetta

Der Stamm *Escherichia coli* Rosetta ist mit dem Vektor pRARE transformiert, welcher die Coexpression selten verwendeter *E. coli* t-RNAs ermöglicht. Dies ist für die Translation der FTF-Codons AGA (Arginin), GGA (Glycin) und CUA (Leucin) vorteilhaft.

4.2.3.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen und sind detailliert in der Tab. 4.2.3 dargestellt.

Tab. 4.2.3: Oligonukleotide

Bezeichnung	DNA-Sequenzen (5' → 3')	Merkmale
FTF-X-Zymefwd		Einfügen von <i>NdeI</i> -site
FTF-X-Zymerv		Einfügen von <i>XhoI</i> -site
T7 Primer prom	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierungsprimer
T7 Primer term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierungsprimer
pASKIBAfwd	CCATGGccAAAGAAACGAACCAAAAGCC	Einfügen von <i>NcoI</i> -site
pASKIBArv	CTCGAG TTTGTAACTGTTAATTGTC	Einfügen von <i>XhoI</i> -site

4.3 Molekularbiologische Arbeiten

4.3.1 Präparation von Plasmiden

Für die Plasmid-Präparation wird das „QIAprep Spin Miniprep“ Kit (Fa. Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dazu werden 3 ml einer Übernachtskultivierung lysiert und die freigesetzte Plasmid-DNA über eine Silikatmatrix aufgereinigt.

4.3.2 Bestimmung von DNA-Konzentration durch NanoDrop

Die Messung von DNA-Konzentrationen erfolgt mit dem NanoDrop-Photometer (Fa. Nanodrop Technologies) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei wird die Extinktion von 2 µl DNA-Probe gegen den Elutionspuffer oder entsprechend Milli-Q Wasser als Referenz vermessen.

4.3.3 *In vitro* Rekombination von DNA

Die Isolierung und Rekombination von DNA erfolgt nach Standardprozeduren von Sambrook *et al.* (1989).

4.3.4 Restriktionsverdau

Die DNA-Restriktionen werden in einfach konzentrierten Reaktionspuffern durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wird für 1 µg enthaltene DNA eine Unit der entsprechenden Restriktionsendonuklease für präparative und analytische DNA-Restriktionen eingesetzt. Der Restriktionsverdau wird für 20 min bei 37 °C und 300 rpm inkubiert.

Die Restriktionsansätze werden wie folgt pipettiert:

Insert-DNA		Plasmid-DNA	
Insert	5,0 µl	Plasmid	1,0 - 16,0 µl
10 x FastDigest Buffer	2,0 µl	10 x FastDigest Buffer	4,0 µl
Restriktionsenzym I	1,0 µl	Restriktionsenzym I	1,0 µl
Restriktionsenzym II	1,0 µl	Restriktionsenzym II	1,0 µl
Milli-Q Wasser	11,0 µl	Milli-Q Wasser	auf 40,0 µl

4.3.5 Dephosphorylierung

Nach der Restriktion werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen der Plasmidfragmente durch Zugabe von 1,0 µl Alkaline Phosphatase Fast AP desphosphoryliert. Der Ansatz wird für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 80 °C hitzeinaktiviert.

4.3.6 Ethanolfällung

Die Aufreinigung der geschnittenen Plasmidfragmente erfolgt durch Zugabe von 5,0 µl Natriumacetatlösung (300 mM) und 150,0 µl Ethanol zum Reaktionsansatz, welcher nach einer Durchmischung bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert wird. Die präzipitierte Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 150,0 µl 70 %-igem Ethanol bei 13000 rpm für 10 min gewaschen. Das Pellet wird in 20,0 µl Milli-Q Wasser gelöst.

4.3.7 Klonierung und Polymerase-Kettenreaktion

Die FTF-Inserts werden zunächst von der Fa. X-Zyme über Primer (Kapitel 4.2.3.3) aus der genomischen DNA von *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 amplifiziert. Ein Homologievergleich mit bereits bekannten Glycosyltransferasesequenzen aus *Bacillus*-Stämmen (Kunst *et al.*, 1997) wird anhand der N-terminal ansequenzierten Peptidkette durchgeführt und führt zur Ableitung der benötigten Primersequenzen. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird Titanium taq-Polymerase (Fa. Clontech) verwendet. Die eingesetzten Primer ermöglichen die Restriktion am 5'Ende durch NdeI bzw. am 3'Ende durch XhoI und somit die Klonierung in den Vektor pET-24+. Die NdeI-Schnittstelle beinhaltet das Startcodon, während das Stopcodon durch die XhoI-Schnittstelle ersetzt wird und die C-terminale Fusion mit einem (His)₆-Tag gewährleistet. Die optimale Translation wird durch die bestmögliche Entfernung zwischen Startcodon und der ribosomalen Bindestelle eingestellt.

Für die spätere Umklonierung des FTF-Gens aus dem Vektor p24FTF in den Vektor pASK-IBA63b+ werden zunächst T7-Primer zur Isolierung verwendet. Die *in vitro* Rekombination wird über konstruierte Primer (Kapitel 4.2.3.3) ermöglicht. Für die PCR-Amplifikation des FTF-Gens wird das Phusion High Fidelity PCR Kit verwendet. Der Phusion Master Mix (Fa. New England Biolabs) enthält den HF-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, die dNTPs (400 µM) und die DNA-Polymerase (0,04 U/µl).

Das einklonierte FTF-Gen wird durch die Fa. Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) zur Kontrolle sequenziert. Die überprüfte FTF-Sequenz wird über pASKIBAfwd- bzw. pASKIBArv amplifiziert und dabei auch das Signalpeptid entfernt. Durch eine NcoI- bzw. XhoI Schnittstelle wird das FTF-Gen in den Vektor pASK-IBA63+ überführt. Das FTF-Leseraster wird durch Insertion eines Alanincodons eingestellt. Die XhoI-Schnittstelle ist mit einer Strep-Tag-Sequenz zur affinitätschromatographischen Aufreinigung fusioniert.

Der PCR-Reaktionsansatz wird nach folgendem Schema pipettiert:

PCR-Reaktionsansatz

Template	2,0 µl	(15 - 30 ng/µl)
Primermix (fw/rev)	2,0 µl	(je Primer 5,0 pM)
Phusion Master Mix (2x)	2,0 µl	
Milli-Q Wasser	2,0 µl	

Die Hybridisierungstemperatur wird anhand der Primersequenzen angepasst, damit die DNA-Stränge mit den DNA-Primern komplementär binden und unspezifische PCR-Produkte vermieden werden.

Für den PCR-Verlauf werden folgende Programmierungen verwendet:

PCR-Phase	Isolierung genomische DNA			Umklonierung FTF-Gen		
	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	95	07:00	1	98	02:30	1
Denaturierung	95	01:00	35	98	00:10	29
Annealing	54	01:00		61	00:15	
Elongation	68	02:00		72	00:25	
	68	10:00	1	72	05:00	1
Kühlung	4			4		

4.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Das FTF-PCR-Fragment wird mittels Rapid DNA Ligation Kit (Fa. Roche) mit dem p24-Vektor in einem molaren Verhältnis von 8:1 ligiert (für 10 min bei 20 °C).

Zur Ligation der umklonierten DNA-Fragmente mit den Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren wird das Rapid Ligation Kit (Fa. Fermentas) verwendet. Die T4 DNA-Ligase verknüpft die durch Restriktion entstandenen kompatiblen, kohäsiven Enden des Vektors mit denen des DNA-Inserts. Das DNA-Insert wird im dreifach molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt und für 10 min bei 20 °C ligiert. Der Ligationsansatz wird für mindestens 16 Stunden bei 11 °C inkubiert. Die Ligationsansätze werden wie folgt pipettiert:

Ligationsansatz

T4-DNA Ligase	1,0 µl	(5 Units)
Fast Ligation Buffer (5x)	4,0 µl	
Insert	1,0 - 4,0 µl	(3-fach molar zum Vektor)
Vektor	1,0 - 13,0 µl	(30 ng)
Milli-Q Wasser	auf 20,0 µl	

4.3.9 Chloroformextraktion

Der Ligationsansatz wird zur Inaktivierung der T4-DNA Ligase mit dem vierfachen Volumen Chloroform gemischt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird, ohne die proteinhaltige Grenzschicht zu verletzen, abgenommen und für die Transformation eingesetzt.

4.3.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente werden in 1,5 %-igen Agarosegelen entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die erhitzte Agaroselösung wird etwa 8 mm dick in den Elektrophoreseschlitten gegossen und nach dem Erstarren mit 1x TAE-Puffer überschichtet.

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x)

Tris-Acetat pH 8,5	40,0 mM
EDTA	1,0 mM

► Agarose-Gel:

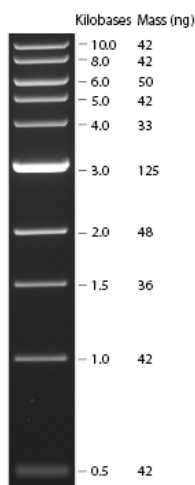
Agarose in 1x TAE-Puffer lösen 1,5 % (w/v)

Zur Probenvorbereitung werden 20 µl DNA-Probe mit 3 µl Ladepuffer gemischt und in die Probetaschen des Geles pipettiert. Die Größenzuordnung und Quantifizierung der DNA-Proben wird durch die Standards Quick Load 1 kb DNA Ladder und TriDye 2-long DNA Ladder (Fa. New England Biolabs) ermöglicht.

Ladepuffer

Glycerin	30,00 % (v/v)
Xylencyanol FF	0,25 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

Quick Load 1 kb DNA Ladder Fa. New England Biolabs



TriDye 2-long DNA Ladder Fa. New England Biolabs

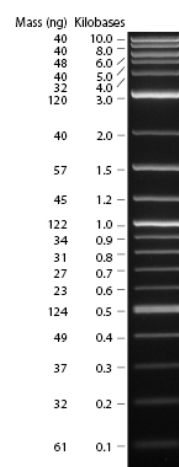


Abb. 4.3.1: DNA Größenstandards

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente ergibt sich aus der Porengröße, dem verwendeten Puffer sowie der Konformation und Größe der DNA selbst. Die Agarose-Gelelektrophorese wird bei einer Spannung 100 V für 60 min durchgeführt. Das Agarosegel wird anschließend 30 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) inkubiert und unter UV-Licht (312 nm) detektiert und dokumentiert.

4.3.11 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus der PCR und aus DNA-Restriktionen erfolgt durch die Auftrennung in Agarosegelen. Die mittels Ethidiumbromid detektierten DNA-Fragmente werden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und durch das Qiaquick Gel Extraktion Kit (Fa. Qiagen) aus den excisierten Gelbanden extrahiert.

4.4 Mikrobiologische Arbeiten

4.4.1 Sterilisation

Die verwendeten Kulturmedien werden für 20 min bei 120 °C und 1,0 bar Überdruck dampfsterilisiert. Maillard- oder Zerfallsreaktionen sowie Salzausfällungen von temperaturempfindlichen Lösungen und Substanzen werden durch Sterilfiltration (0,2 µm Porendurchmesser) vermieden.

Die Sterilisation von Glasgefäßen erfolgt für 10 min Sterilisierdauer bei einer Temperatur von 134 °C.

Alle mikrobiologischen Arbeitsschritte werden unter der Sterilwerkbank durchgeführt, wobei die Einlaufzeit von 15 Minuten den laminaren Luftstrom zum Produktschutz gewährleistet. Vor und nach den Arbeiten an der Sterilwerkbank werden die Oberflächen mit 70 % Ethanol desinfiziert.

Die Pufferbasis (KH_2PO_4 / Na_2HPO_4) des Minimalmediums für die Kultivierung von *Bacillus subtilis* wird autoklaviert. Die Spurenelemente inklusive Magnesiumsulfat sowie die Stickstoff- und Kohlenstoffquelle werden als Stammlösung gelöst und vor der Zugabe zur Pufferbasis sterilfiltriert.

4.4.2 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation mit Klonierungs- und Expressionsvektoren werden bereits kompetente *Escherichia coli* Stämme (Kapitel 4.2.3.1) verwendet. Die Zellen werden auf Eis aufgetaut und ein 40 µl Aliquot mit 5 µl des Ligationsansatzes oder 1 µl aufgereinigtes Plasmid vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wird der Transformationsansatz kurzzeitig für 30 sek auf 42 °C erwärmt und anschließend für 5 min auf Eis gekühlt. Es werden 950 µl LB Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 500 rpm kultiviert. 150 µl der Zellsuspension werden direkt auf vortemperierte antibiotikahaltige Agarplatten ausgestrichen. Der Rest des verbliebenen Überstandes wird kurz an zentrifugiert, das Zellpellet in 50 µl LB Medium aufgenommen und ausgestrichen. Die Agarplatten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.4.3 Native Proteinexpression von SacB aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

Bacillus subtilis Kulturen werden für die kurzfristige Stammhaltung (Kapitel 4.4.5) zum Animpfen der Vorkulturen auf Agar-Mineralsalzmedium mit 1 % (v/v) Saccharose für 40 bis 48 h bei 37 °C kultiviert. Für die Vorkulturen werden 50 ml Minimalmedium mit 1 %-igem Saccharosezusatz beimpft und in Kulturkolben mit Schikane für 24 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Für die Hauptkultur (250 ml) wird eine Anfangskonzentration von 0,012 g/l Bakterienbiotrockenmasse eingestellt. Die FTF wird konstitutiv ins Medium sekretiert. Die Kultur wird bis zum Ende der exponentiellen Phase (30 - 40 h) bei 37 °C und 150 rpm in Kulturkolben mit Schikane inkubiert. Das FTF-haltige Medium wird durch Zentrifugation für 20 min bei 12000 g und 4 °C von den mikrobiellen Bestandteilen separiert.

Kulturmedium für *Bacillus subtilis* nach Jayasuriya (1955)

KH ₂ PO ₄	1,36 g/l
Na ₂ HPO ₄	2,13 g/l
Saccharose	10,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
Spurenelemente:	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	10,0 mg/l
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5,0 mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	1,3 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,5 mg/l

Ein semidefiniertes Kulturmedium zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wird durch eine Zugabe von maximal 0,1 % (w/v) des Komplexbestandteiles Hefeextrakt erreicht.

4.4.4 Heterologe Proteinexpression von SacB mit *Escherichia coli*

Zur Überexpression der heterolog hergestellten FTF werden die rekombinanten *Escherichia coli* Stämme zunächst in einer 50 ml LB-Vorkultur über Nacht bei 37 °C bei 170 rpm in Kolben mit Schikane kultiviert. Die anschließende Hauptkultivierung wird in 500 ml LB-Medium in Kulturkolben mit Schikane bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wird mit 1 % des Eigenvolumens aus der Vorkultur inokuliert und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 wird die rekombinante Proteinexpression mit dem Induktionszusatz eingeleitet. Mit Übergang in die stationäre Wachstumsphase, werden die Zellen mittels Zentrifugation für 15 min bei 4000 g und 4 °C abgetrennt. Um den Selektionsdruck zugunsten der rekombinanten Zellen zu gewährleisten, wird den Medien entsprechend der plasmidcodierten Resistenz Antibiotika zugesetzt.

Kulturmedium nach Luria-Bertani (LB-Medium)

Pepton	10,0 g/l
Hefeextrakt	5,0 g/l
NaCl	5,0 g/l

Zusätze für Kulturmedien

Luria-Bertani (LB) Agaroseplatten

Kulturmedium nach Luria-Bertani	
Bakto Agar	15,0 g/l

Antibiotika

Ampicillin	100,0 mg/l
Kanamycin	50,0 mg/l

Induktionszusätze für die rekombinante Proteinexpression

IPTG	500,0 µMol
Anhydrotetracyclin	200,0 µg/l

4.4.5 Kurzfristige Stammhaltung

Die Bakterienstämme werden unter sterilen Bedingungen auf Agarnährmedien ausgestrichen und unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Bei *Escherichia coli* Stämmen wird über Nacht auf LB-Medien und bei *Bacillus subtilis* 40 - 48 h auf Agar-Mineralsalzmedium mit 1 % Saccharosezusatz inkubiert. Nährmedien für transformierte Bakterienstämme enthalten zur Selektion entsprechende Antibiotikazusätze. Die Bakterienausstriche werden mit Parafilm (Fa. Pechiney Plastic Packaging) versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Bakterien werden im Abstand von zwei Wochen neu überimpft.

4.4.6 Langfristige Stammhaltung

Für eine dauerhafte Stammarchivierung werden Glycerinstockkulturen angelegt. Dazu werden 800 µl aus einer über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubierten Schüttelkolbenkultur mit 200 µl steriler Glycerinlösung (85 % v/v) vermischt. Die langfristige Konservierung erfolgt durch anschließende Lagerung bei -80 °C.

4.4.7 Photometrische Bestimmung der Bakteriendichte

Die Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur ermöglicht eine schnelle Beurteilung des mikrobiellen Wachstums während des Kultivierungsverlaufes. Durch die Annahme, dass sich das Verhältnis der Zellzahl zur Zellmasse konstant verhält, können

äquivalent zur photometrischen Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, Rückschlüsse auf die gebildete Biomasse gezogen werden.

Die optische Dichte der *Bacillus subtilis* Kultivierungen wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 580 nm und von *Escherichia coli* Kulturen bei 600 nm gegen das reine Medium bestimmt. Die Proben werden gegebenenfalls mit Milli-Q Wasser verdünnt, damit der lineare Messbereich über eine Extinktion von 1,0 nicht überschritten wird.

4.4.8 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur gravimetrischen Ermittlung der Biotrockenmasse werden bei den Versuchen mit *Bacillus subtilis* jeweils 1 ml Kulturprobe in trockene Kunststoffreaktionsgefäße pipettiert und für 5 min bei 4 °C und 13400 rpm (Fresco 21, Fa. Thermo Scientific) zentrifugiert. Die Zellpellets werden mit 1 ml Milli-Q Wasser gewaschen, erneut 5 min bei 13400 rpm zentrifugiert und bis zur Gewichtskonstanz bei 100 °C getrocknet. Zur Bestimmung wird das arithmetische Mittel aus der Mehrfachbestimmung gebildet.

Durch den Waschschrift soll der Einfluss von sich im Laufe der Kultivierung verändernden Medienbestandteilen, wie Saccharose und Fructankonzentrationen, berücksichtigt werden.

Bei den Versuchen mit *Escherichia coli* Kulturen werden für die exakte Dokumentation der Biotrockenmasse jeweils 5 ml Zellsuspension in den vorgetrockneten Reaktionsgefäßen verwendet.

Die Biotrockenmasse rekombinanter Bakterienkulturen wird mehrfach mit jeweils 300 µl Probe der bereits umgepufferten Bakteriensuspension bestimmt.

4.4.9 Herstellung von Proteinextrakt mittels Ultraschallaufschluss

Die rekombinanten *Escherichia coli* Kulturen werden zur Gewinnung der FTF durch Ultraschallaufschluss lysiert. Dadurch wird sowohl löslich vorliegende FTF freigesetzt als auch die Isolierung und Gewinnung von FTF aus inclusion bodies ermöglicht. Die Zellsuspension aus der Kultivierung wird für 15 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet von 500 ml Kultur wird in 4 ml vorgekühlten Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,0) aufgenommen. Der Ultraschallaufschluss (Sonotrode MS73, Fa. Bandelin) wird jeweils in zwei Schritten für je 4 min bei 80 % Leistung und 50 % Impulsintervall durchgeführt. Um eine temperaturbedingte Desintegration des Proteins zu vermeiden, wird während des Ultraschalleintrages und zwischen den Aufschlussschritten auf Eis gekühlt. Die Zellbruchstücke werden von der löslichen Proteinfraction durch Zentrifugation für 45 min bei 12000 g und 4 °C getrennt.

4.5 Methoden zur Proteinaufarbeitung

4.5.1 Gewinnung rekombinanter FTF aus inclusion bodies

Ein großer Anteil der FTF liegt bei der heterologen Überexpression in *Escherichia coli* in Form inclusion bodies vor, welche sich als unlösliche Bestandteile im Zellpellet anreichern. Die Einschlusskörper werden aufgrund ihrer höheren Dichte gegenüber den restlichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation isoliert. Die Resolubilisierung der Proteine erfolgt durch die denaturierenden chaotropen Eigenschaften einer 8 M Harnstofflösung. Die anschließende Rückfaltung in die aktive Enzymkonformation wird mittels Dialyse umgesetzt.

4.5.1.1 Aufarbeitung von inclusion bodies aus rekombinant hergestellter FTF

Für die Optimierung der Kultivierungsparameter zur Ausbeutesteigerung der rekombinant in *Escherichia coli* produzierten FTF werden die erhaltenen Zellpellets aus 5 ml Kulturprobe untersucht. Diese werden in 1 ml Detergenspuffer suspendiert. Die Proben werden für 10 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert. Das Pellet wird dreimal mit 1 ml Triton X-Lösung gewaschen und je 10 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert.

Für die Isolierung und Aufarbeitung größerer Mengen inclusion bodies wird pro Gramm Zellpelletfeuchtmasse 50 ml Detergenspuffer eingesetzt. Für die Waschschrte mit Triton X-Lösung werden je 40 ml verwendet. Die Zentrifugation erfolgt wie bereits angegeben.

Detergenspuffer

NaCl	0,2	M
Desoxycholsäure	300,0	% (w/v)
IGEPAL CA-360	16,0	% (v/v)

► mit Milli-Q Wasser auf ein Gesamtvolumen 100 ml

Triton X-Lösung

Triton X-100	1,0	% (v/v)
EDTA	1,0	mM

► mit Milli-Q Wasser auf ein Gesamtvolumen 100 ml

4.5.1.2 Solubilisierung der FTF-haltigen inclusion bodies

Für die Proben aus dem Kultivierungsverlauf (Kapitel 4.9.3) werden die aufgereinigten und pelletierten inclusion bodies in 1 ml Denaturierungspuffer solubilisiert.

Zur Herstellung hochkonzentrierter FTF-Präparate hoher Proteinkonzentrationen werden proteingesättigte Harnstofflösungen (> 2,5 g/l) aus den inclusion bodies erzeugt. Dazu werden maximal 35 ml Denaturierungspuffer pro Gramm inclusion bodies für die Resolubilisate eingesetzt.

Der Denaturierungspuffer bewirkt durch den Harnstoff eine Auflösung der Proteinaggregate, so dass die Wechselwirkungen zwischen den Polypeptidsträngen aufgehoben werden. Um eine vollständige Auflösung zu erreichen, wird die Lösung im Ultraschallbad resuspendiert. Anschließend wird für 10 min bei 4 °C und 21000 g zentrifugiert.

Denaturierungspuffer

Harnstoff	8,0 M
Tris-HCl (pH 8,0)	50,0 mM
EDTA	1,0 mM

► mit Milli-Q Wasser auf ein Gesamtvolumen 100 ml

4.5.2 Dialyse der Proteinlösungen

Für die präparative FPLC werden zur Umpufferung Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (7000 MWCO Ausschlussgrenze, 3 - 12 ml Volumen) eingesetzt. Die Dialyse wird in drei Schritten zunächst für 2 h und 6 h mit je 1,0 l Dialysepuffer und anschließend mit 3,0 l Dialysepuffer über Nacht durchgeführt. Die Diffusion wird generell durch leichtes Rühren des Dialysepuffers unterstützt. Nach der Auftrennung mittels FPLC werden FTF-haltige Fraktionen zum Entsalzen und Umpuffern gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) ebenfalls in drei Schritten dialysiert.

Für die Renaturierung der in Harnstoff gelösten rekombinanten FTF aus den inclusion bodies wird der Überstand in Dialysereaktionsgefäße oder bei Volumina von 5 - 100 ml direkt in vorbehandelte Dialyseschläuche (Trenngrenze 6000 - 8000 MWCO, Größe1, Fa. Spectrum) gegeben. Die Dialyse der Proben wird gegen das 100-fache des Probevolumens mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) mit zweimaligem Wechsel der Dialyselösung durchgeführt. Nach dem zweiten Wechsel wird über Nacht dialysiert.

Durch die Zentrifugation für 10 min bei 15000 g und 4 °C wird ausgefallenes Protein entfernt und die Probe für eine weitere Solubilisierung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung der trockenen Dialysemembranschläuche werden diese für 30 min in Milli-Q Wasser hydriert und anschließend für 2 h in Natriumhydrogencarbonat-Puffer bei 60 °C leicht gerührt. Glycerin, Schwermetalle und Proteasen werden durch diese Prozedur entfernt. Es folgen je drei Waschschrte für 1 h bei 60 °C in Milli-Q Wasser mit Spülen des Schlauches. Die vorbereiteten Schläuche werden in 20 %-igen Ethanol bei 4 °C aufbewahrt und vor der Verwendung gründlich mit Milli-Q Wasser gespült.

Natriumhydrogencarbonat-Puffer

NaHCO ₃	0,1 M
EDTA	10,0 mM

► in Milli-Q Wasser

4.5.3 Aufkonzentrierung und Reinigung von Proteinen

Der Faktor der Aufkonzentrierung bezieht sich auf das Volumen des resultierenden Retentats gegenüber dem Ausgangsvolumen des eingesetzten Kulturüberstandes.

4.5.3.1 Proteinkonzentrierung durch Zentrifugation

Eine Aufkonzentrierung der Proteine aus den Kulturüberständen erfolgt mittels Viva-Spin-Concentrator (0,5 ml und 20 ml, 10,000 & 30,000 MWCO PES (*Bacillus subtilis* NCIMB 11871), 50,000 MWCO PES (*Aspergillus niger* AB 1.13), Fa. Viva Science AG; Hannover). Diese Proteinanreicherung dient nicht nur der Separation von kleineren Enzymen sondern auch der Erhöhung volumetrischer Aktivitäten.

Die Konzentrierung kleiner Volumina erfolgt mittels Tischzentrifuge mit Festwinkelrotor (5415 C, Fa. Eppendorf) bzw. für große Volumina in einer Untertischzentrifuge mit Festwinkelrotor (Jouan AM 50.14) mit 8000 rpm für 3x 30 min. Alle Zentrifugationsschritte werden unter Kühlung bei 4 °C durchgeführt.

4.5.3.2 Proteinkonzentrierung durch Querstromfiltration

Der zentrifugierte Kulturüberstand wird zunächst über eine Unterdruckfiltration mit Blotpapier sowie mit Filtration mittels Faltenfilter vorgeklärt. Dies dient der Abtrennung von Levanresten und Zellaggregaten. Der Überstand wird durch die Filtration über eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm) zellfrei. Es werden keine Wechselwirkungen zum cellulosehaltigen Filtrationsmaterial festgestellt, so dass aus der Filtration keine Aktivitätsverluste resultieren.

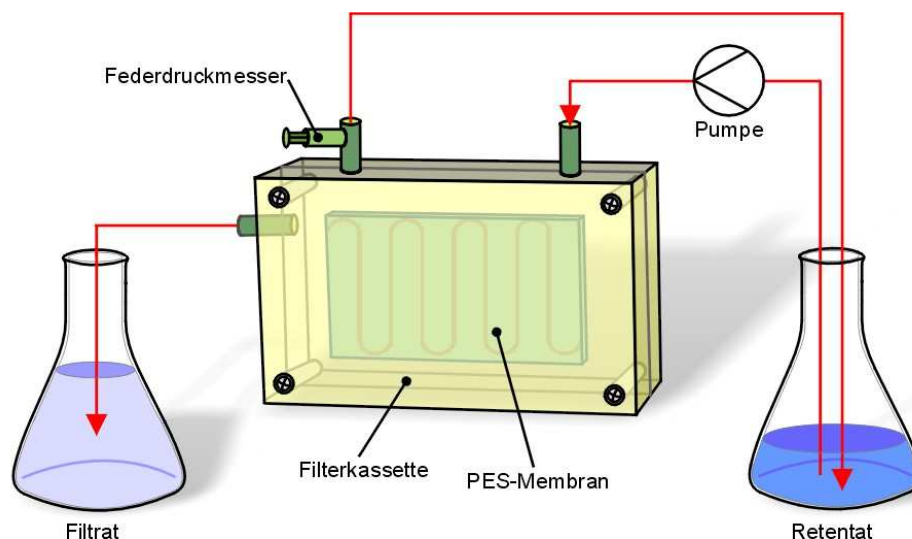


Abb. 4.5.1: Schematische Darstellung der Querstromfiltration

Zur Aufkonzentrierung von Kulturüberstand aus *Bacillus subtilis* Kultivierungen wird ein Membranfilter mit tangentialem Strömungsprinzip bis zu einem Maximaldruck von 4 bar eingesetzt. Dazu wird das Viva-Flow 200 System verwendet, für *Bacillus subtilis* NCIMB 66

11871 mit 30,000 MWCO PES und für *Aspergillus niger* AB 1.13 50,000 MWCO PES (aktive Membranfläche 200 cm², Fa. Sartorius). Zur Proteinanreicherung wird der Retentatstrom in den Kulturüberstand zurückgeführt und rezirkuliert (Abb. 4.5.1). Vor der Filtration wird die Desinfektionslösung mit dem 10-fachen Totvolumen an Milli-Q Wasser ausgespült. Nach der Filtration wird die Anlage mit CIP-Reinigungslösung gespült und zur Lagerung mit Desinfektionslösung gefüllt.

CIP-Lösung

NaCl	1,0 mol/l
NaOH	0,5 mol/l

► in Milli-Q Wasser

Desinfektionslösung

Natriumacetat	0,2 mol/l
Ethanol	20,0 % (v/v)
Milli-Q Wasser	80,0 % (v/v)

4.5.3.3 Poly-Histidin-Tag Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von His₆-Tag-Fusionsproteinen wird durch die selektive Interaktion zu immobilisierten Ni²⁺-NTA-Konjugaten durch die Ausbildung eines reversiblen Metallchelatkompleses ermöglicht (Hochuli *et al.*, 1988). Die an Sepharose immobilisierte Nitrilotriessigsäure ist mit Ni²⁺ kovalent verbunden, welches über die Elektronen der exponierten aromatischen Histidinringe am Fusionsprotein bindet. Unspezifische Wechselwirkungen werden durch Zugabe von 10 mM Imidazol zum Lysepuffer unterdrückt. Die Elution des Zielproteins wird durch eine Konzentration von 250 mM Imidazol gewährleistet.

Für die Auftrennung wird Ni²⁺-NTA-Sepharose (Fa. IBA) verwendet. Das einfache Säulenvolumen an Zelllysate wird auf die Säule aufgetragen und mit dem fünffachen Säulenvolumen an Waschpuffer gespült. Der Elutionspuffer wird in sechs Schritten je halbes Säulenvolumen aufgegeben und die Eluatfraktionen mit His₆-Tag fusionierte FTF weiter untersucht. Zur Reinigung des Säulenmaterials wird die Säule mit 0,5 M NaOH gespült und 30 min bei 20 °C inkubiert. Die Aufbewahrung erfolgt in 30 % Ethanol bei 4 °C.

Pufferlösungen für die His₆-Tag Affinitätschromatographie

Basis-Puffer

NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ pH 8,0	50,0 mM
NaCl	300,0 mM

Lysepuffer ► Zugabe von Imidazol 10,0 mM

Waschpuffer ► Zugabe von Imidazol 20,0 mM

Elutionspuffer ► Zugabe von Imidazol 250,0 mM

4.5.3.4 Strep-Tag / Strep-Tactin Affinitätschromatographie

Das C-terminal an die rekombinante FTF fusionierte Strep-Tag II-Peptid besteht aus acht Aminosäuren (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), welche aufgrund von ionischen Wechselwirkungen eine sehr hohe Bindungsaffinität zum Strep-Tactin aufweist (Skerra und Schmidt, 2000). Strep-Tactin wird aus dem bakteriellen Streptavidin hinsichtlich höherer Aufreinigungseffizienz weiterentwickelt und besteht aus vier gleichen Proteinuntereinheiten mit je einer Strep-Tag-Bindungsstelle. Das immobilisierte Strep-Tactin (Superflow-Resin, Fa. IBA) ist an 6 %-ige quervernetzte Agarose gekoppelt. Das Material besitzt eine Bindungskapazität von 50 - 100 nmol/ml und ermöglicht über die hohe Durchflussrate von 5 cm/min eine schnelle Aufarbeitung im Einschrittverfahren. Die Desorption erfolgt mittels Zusatz von Desthiobiotin zum Puffer, welches aufgrund der höheren Bindungsaffinität die Proteine kompetitiv von den Bindungsstellen verdrängt.

Die Proben werden vor dem Auftragen für 45 min bei 21000 g und 4 °C zentrifugiert, um entstandene Proteinaggregate zu entfernen. Das Volumen des Zellextraktes wird im äquivalenten Verhältnis zum Säulenvolumen aufgetragen und anschließend wird das unspezifische Wirtsp Protein durch Spülen mit dem fünffachen Säulenvolumen an Waschpuffer ausgetragen. Durch die schrittweise Zugabe des dreifachen Säulenvolumens an Elutionspuffer kann in den Eluatfraktionen die Strep-Tag fusionierte FTF gewonnen werden.

Pufferlösungen für die Strep-Tag Affinitätschromatographie

Waschpuffer

Tris-HCl pH 8,0	100,0	mM
NaCl	150,0	mM
EDTA	1,0	mM

Elutionspuffer ► Zugabe von Desthiobiotin 2,5 mM

Regenerationspuffer ► Zugabe von Hydroxy-Azophenyl-Benzoessäure 1,0 mM

Die Regeneration erfolgt durch Spülen mit dem 15-fachen Säulenvolumen an Regenerationspuffer und die Lagerung mit diesem Puffer bei 4 °C.

4.5.4 Proteinflüssigkeitschromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography)

Für die ionenchromatographische Aufreinigung werden native Kulturüberstände verwendet. Mit den Anionentauschern Source 30Q (30 ml Bettvolumen, 45 mg_{BSA}/ml Kapazität, Fa. Amersham Bioscience), Resource Q (1 ml Bettvolumen, 45 mg_{BSA}/ml Kapazität, Fa. Pharmacia) sowie dem Kationentauscher CM Sepharose (30 ml Bettvolumen, 50 mg_{RNase}/ml Kapazität, Fa. GE Healthcare) wird die FTF angereichert und aufgereinigt. Bei den Anionentauschern gehen die an eine Polystyrol/Divinylbenzol-Matrix gekoppelten quartären Ammoniumionen reversible Wechselwirkungen zu den Aminosäureresten der enthaltenen Proteine ein. Beim Kationentauscher dienen Carboxymethylreste an einer quervernetzten Agarosematrix als stationäre Phase.

Zur Beladung der Säule werden 50 ml konzentrierter Kulturüberstand mit einer Durchflussrate von 1,0 ml/min eingesetzt. Die rekombinant hergestellte FTF aus den *E. coli* Zelllysaten wird ebenfalls mit dem Ionentauscher Resource Q aufgereinigt. Dazu werden 2,0 ml Proteinextrakt bei einem Durchfluss von 0,1 ml/min aufgetragen. Der 30 minütige Waschschrift erfolgt wie die ladungsspezifische Elution der Proteine bei 1,0 ml/min Durchfluss. Die Elution erfolgt in zwei Schritten mit einem linear steigenden NaCl-Ionengradienten bis 2 Mol.

Der Elutionsdurchlauf wird in 5 ml Fraktionen aufgefangen und enthaltene Proteine werden mittels UV-Detektor bei 280 nm bei einer Verstärkung von 0,2 bzw. 1,0 über einen Schreiber (Vorschub 2 mm/min) detektiert.

Gradientenprogramm FPLC

1. Zeit (min)	0 - 120	120 - 150	150 - 330	330 - 370	Resource Q
Elutionslösung (%)	0	0	0 → 60	60 → 100	
2. Zeit (min)	0 - 120	120 - 160	160 - 280	280 - 320	Source 30Q
Elutionslösung (%)	0	0	0 → 60	60 → 100	
3. Zeit (min)	0 - 10	10 - 40	40 - 160	160 - 205	CM Sepharose
Elutionslösung (%)	0	0	0 → 60	60 → 100	

FPLC-Lösungen (vakuumtgest)

Resource Q / Source 30Q)

Laufmittel

Tris (pH 7,0) 100,0 mM

Elutionsmittel

Tris (pH 7,0) 100,0 mM

NaCl 2,0 M

► in Milli-Q Wasser

CM Sepharose

Laufmittel

Phosphatpuffer (pH 6,0) 50,0 mM

Elutionsmittel

Phosphatpuffer (pH 6,0) 1,0 M

4.5.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

In saurem Milieu bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den basischen und unpolaren Aminosäuren von Proteinen stabile Farbstoff-Protein-Komplexe. Durch die Bildung von der komplexierten anionischen Sulfonatform des Farbstoffes verschiebt sich das Absorptionsmaximum in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration von 470 nm auf 595 nm.

Durch die Messung der Extinktion gegen das freie Farbreagenz wird die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Standardkalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA: 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 g/l) quantitativ bestimmt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der *Bacillus subtilis* Kultivierungen erfolgt in 96-Well-Platten (Bio-One, Fa. Greiner) über die photometrische Messung mit dem GENios Reader (Fa. Tecan). Bei gering konzentrierten Kultivierungsüberständen werden 20 µl Probe auf 100 µl der Bradford-Gebrauchslösung gegeben und nach 10 min Inkubation bei 20 °C bei 595 nm photometrisch vermessen. Für die proteinreichen *Escherichia coli* Proben werden 20 µl Probe auf 1 ml Bradford-Gebrauchslösung gegeben und 10 min bei 20 °C inkubiert. Eine Verdünnung der Probe erfolgt entsprechend des linearen Messbereiches des Photometers (6315, Fa. Jenway).

Bradford Stammlösung

Coomassie-Brillant-Blau G-250	300 mg
Methanol	300 ml
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	600 ml
► kühl und dunkel lagern	

Bradford Gebrauchslösung

Bradford Gebrauchslösung	150 ml
► mit Milli-Q Wasser auf 1000 ml auffüllen	

4.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration durch NanoDrop

Das NanoDrop-Photometer (Fa. Nanodrop Technologies) misst die Proteinkonzentration kleiner Probevolumina (0,5 - 2 µl) direkt. Die Extinktion beruht dabei auf einer Absorption des ultravioletten Lichtes bei 280 nm durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin sowie Cystein-Disulfidbrücken.

Die Proben werden gegen 50 mM Phosphatpuffer vermessen und über die Software NanoDrop2000 verarbeitet. Die Messung erfolgt für die Überstände der proteinreichen *Escherichia coli* Proben im unspezifischen Messbereich von 1 mg/ml. Für die FTF wird ein Extinktionskoeffizient von 70250 bestimmt (ProtParam, 2014).

Die Extinktion erfolgt in Korrelation zur Proteinkonzentration nach dem Labert-Beerschen-Gesetz (4.1).

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

E_{λ} : Extinktion; ϵ_{λ} : dekadischer Extinktionskoeffizient [m²/mol]; c: Stoffmengenkonzentration [mol/l]; d: Schichtdicke [m]

4.5.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das anionische Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) denaturiert bei der Probenvorbereitung unter der Mitwirkung des reduzierenden β -Mercaptoethanols die dreidimensionale Struktur des Proteins. Durch die gleichmäßige Negativladung der gebildeten SDS-Protein-Komplexe wird die Eigenladung der Aminosäurereste im Enzym überdeckt, so dass im elektrischen Feld eine einheitliche Laufrichtung gewährleistet ist. Die Beweglichkeiten sind dabei in einer porösen Polyacrylamidmatrix aufgrund der Molekularsiebeigenschaften des Geles umgekehrt proportional zum \log_{10} der molaren Maße des Proteins (Wilson und Goulding, 1991).

Die Polyacrylamidmatrix wird als Gelkassette „ProGel“ mit 12 %-homogenem-Tris-Glycin (1 mm) von der Fa. Anamed Elektrophorese GmbH bezogen oder entsprechend der angegebenen Zusammensetzung (4 % Sammelgel / 12 % Trenngel, 1 mm) selbst hergestellt.

SDS-Polyacrylamid-Gel

4 % Sammelgel		12 % Trenngel	
Milli-Q Wasser	1,00 ml	Milli-Q Wasser	1,30 ml
30 % Acryl-/Bisacrylamid	0,26 ml	30 % Acryl-/Bisacrylamid	1,60 ml
1 M TrisHCl pH 6,8	0,20 ml	1 M TrisHCl pH 8,8	1,00 ml
10 % SDS	15 μ l	10 % SDS	40 μ l
► Lösung luftblasenfrei mischen und APS / TEMED für Polymerisierung hinzugeben			
10 % Ammoniumpersulfat	15 μ l	10 % Ammoniumpersulfat	40 μ l
TEMED	2 μ l	TEMED	2 μ l

► Lösungen schnell mischen und luftblasenfrei zwischen die Glasplatten pipettieren, erst das Trenngel bis 1 cm unter den Probenkamm (wässriges Butanol aufgeben, 45 min Polymerisationszeit), dann das Butanol entfernen und mit dem Sammelgel überschichten (Probenkamm einfügen, 45 min Polymerisationszeit)

Zur Probenvorbereitung werden 24 μ l der Probe mit 8 μ l 4x SDS-Puffer vermischt und für 5 min bei 100 °C erhitzt. Pro Geltasche werden bei den Gelkassetten 24 μ l und bei den selbst hergestellten Gelen 10 μ l der präparierten Probe aufgetragen.

4-fach SDS-Ladepuffer

Tris	250,0 mM
SDS	8,0 % (w/v)
Glycerol	40,0 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	20,0 % (v/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)

► Mit HCl auf pH 6,8 einstellen und zum Gebrauch den Ladepuffer mit der Proteinprobe auf 1-fache Endkonzentration verdünnen

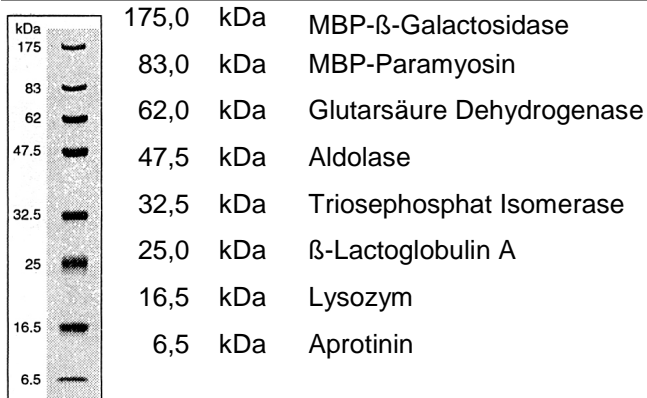
10-fach Elektrophoresepuffer

Tris	30,0 g/l
SDS	30,0 g/l
Glycin	144,0 g/l

► Zum Gebrauch den Puffer auf 1-fache Endkonzentration verdünnen

Als Protein-Größenstandards werden die Proteinmarker „Prestained Protein Marker“ (Fa. New England BioLabs Inc.) und „Precision Plus Protein Standards“ (Fa. BioRad) verwendet.

Prestained Proteinmarker Broad Range, Fa. New England Biolabs



Precision Plus Protein Standards All Blue, Fa. BioRad

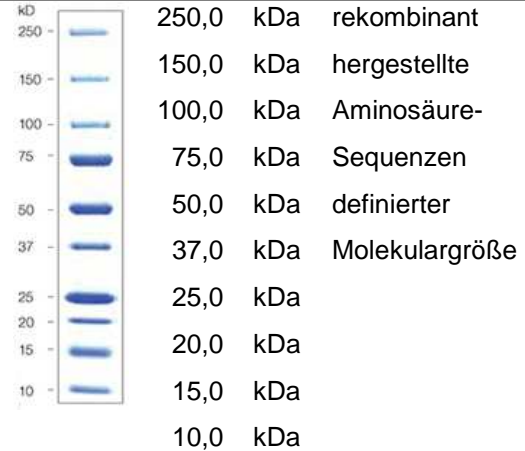


Abb. 4.5.2: Proteinmarker und Proteingrößenstandards

Die SDS-Gelelektrophorese wird für die homogenen Gelkassetten in drei Schritten und für die gegossenen Gele in zwei Schritten durchgeführt.

Elektrophorese-Protokoll für ProGel-Kassetten (Fa. Anamed)

Stufe I	80 V, 30 mA, 3 W, 15 min
Stufe II	120 V, 40 mA, 5 W, 90 min
Stufe III	150 V, 50 mA, 10 W, 30 min

► Stufe I - III werden bis zum Erreichen der Bromphenolbande am unteren Ende des Geles chronologisch durchfahren

Elektrophorese-Protokoll für 4 % Sammelgel / 12 % Trenngel Polyacrylamid

Stufe I	100 V, 3 W, 15 min
Stufe II	200 V, 6 W, 60 min

► Stufe I - II werden bis zum Erreichen der Bromphenolbande am unteren Ende des Geles chronologisch durchfahren

4.5.8 Gel-Färbung mit Coomassie-Brilliantblau

Die Proteinbanden im SDS-Gel werden nach folgendem Färbe-Protokoll detektiert:

Färbe-Protokoll

Fixierlösung	30 min
Färbelösung	120 min
Entfärbelösung	3x 30 min, über Nacht

Es werden folgende Lösungen für die Färbung der SDS-Gele eingesetzt:

Fixierlösung

Trichloressigsäure	20,0	% (v/v)
Milli-Q Wasser	80,0	% (v/v)

Färbelösung

Lösung A		
Coomassie Brilliantblau G-250	0,2	% (w/v)
in Methanol		
Lösung B		
Eisessig	20,0	% (v/v)
Milli-Q Wasser	80,0	% (v/v)

► Vor Gebrauch Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen

Entfärbelösung

Eisessig	10,0	% (v/v)
Methanol	20,0	% (v/v)
Milli-Q Wasser	70,0	% (v/v)

Zur quantitativen Auswertung wird das Gel mit einem BioRad Densitometer (GS-800) gescannt und die Proteinkonzentration mittels der Software Quantity One über die Intensität der Proteinbanden in Bezug auf einen Proteinstandard vermessen. Für die qualitative Dokumentation wird der Scanjet 5300C (Fa. Hewlett) verwendet.

4.5.9 Western Blot

Die Methode des Western Blots ermöglicht den Transfer von Proteinen aus einem Gelelektrophoresetrenngel auf eine Trägermembran. Im Semidry-Blot Verfahren wandern die Proteine in einem senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feld und werden auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) übertragen. Die membrangebundenen Proteine bilden damit eine exakte Kopie des Trennmusters der Proteine im Gel. Die PVDF-Membran wird vor dem Blotvorgang 10 min mit Methanol gewaschen, wodurch Protein-Wechselwirkungen zur hydrophoben Membran im wässrigen Milieu ermöglicht werden. Im

Sandwichverfahren werden das Gel und die PVDF-Membran übereinander gelegt und luftblasenfrei zwischen je 2 Lagen puffergetränktem Whatman Blottingpapier (1,2 mm) geschichtet. Die Schichtung wird mit der PVDF-Membran in Richtung Anode aufgelegt und die Proteine für 25 min bei 15 V übertragen.

Eine anschließende Edman-Sequenzierung ermöglicht die Identifizierung extrazellulärer Proteine bei der *Bacillus subtilis* Kultivierung.

Transfer-Puffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
► auf pH 8,3 einstellen	

4.5.10 Proteinsequenzierung nach Edman

Der Edman-Abbau (Edman, 1949) ermöglicht über die N-terminale Sequenzierung der Aminosäure-Primärstruktur die Identifizierung von Proteinen. Im zyklischen Verfahren können 30 - 40 Aminosäuren identifiziert werden. Die ermittelte AS-Sequenz dient der Identifizierung bereits bekannter Proteinstrukturen bzw. der Ableitung synthetischer Oligonukleotide für das Screening genomischer Gensequenzen. Die auf eine PVDF-Membran geblotteten Proteinbanden (> 75 - 80 % Reinheit) aus einer gelelektrophoretischen Auftrennung werden ausgeschnitten und von der Arbeitsgruppe Biophysikalische Analytik, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig analysiert.

4.6 Methoden zur Analyse von Sacchariden

4.6.1 Quantitativer Nachweis von reduzierenden Zuckern (DNS-Test)

Die bei der Umsetzung von Saccharose freigesetzten reduzierenden Zucker können durch die Redoxreaktion mit Dinitrosalicylsäure (DNS) im alkalischen Milieu quantitativ detektiert werden. Durch die Reduktion der DNS-Nitrogruppe findet eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 540 nm statt und ermöglicht den stöchiometrischen Nachweis der oxidierten Aldosen (Abb. 4.6.1). Unter alkalischen Bedingungen liegt überwiegend die offenkettige Aldehydform des Zuckers vor.

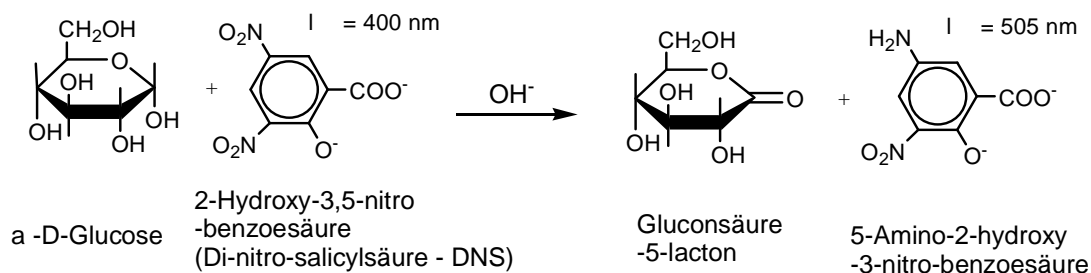


Abb. 4.6.1: Photometrischer Nachweis von Aldehyden nach Sawicki und Sawicki (1976)

Die bei der Hydrolysereaktion freigesetzte Fructose wird über die Keto-Enol-Tautomerie durch das Gleichgewicht mit den beiden Epimeren, Glucose und Mannose, ebenfalls detektiert.

Aus der photometrischen Messung können in Bezug auf eine Glucosekalibrierung die Konzentrationen der Reaktionsprodukte quantitativ ermittelt werden. Durch lineare Regression kann aus der Anfangssteigung der initialen Glucosefreisetzungssrate die Enzymaktivität bestimmt werden (Kapitel 4.10.1).

80 µl der entsprechend verdünnten, hitzeinaktivierten Probe werden in 80 µl vorgelegtes DNS-Reagenz gegeben. Messungen von unverdünnten Reaktionsproben können auch direkt durch Proteindenaturierung infolge des hohen pH-Wertes im DNS-Reagenz abgestoppt werden. Anschließend wird die Probe für 5 min bei 100 °C erhitzt und auf Eis bis zur Messung zurückgestellt. Vor der Messung wird die Probe mit 800 µl Milli-Q Wasser gemischt. Die Proben werden jeweils gegen den Nullwert einer Glucosekalibrierung bei einer Wellenlänge von 540 nm und bis zu einer maximalen Extinktion von 1,0 vermessen.

Die Hitzebehandlung zur Denaturierung der FTF bietet auch bei unterschiedlichen Versuchsdurchführungen gegenüber dem sofortigen Reaktionsstop mit DNS äquivalente Ergebnisse. Eine kurzzeitige Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und daraus resultierende Abweichungen der gemessenen Glucosekonzentrationen werden nicht festgestellt.

DNS-Färbereagenz

3,5-Dinitrosalicylsäure	10,0 g/l
NaOH	300,0 g/l
Kaliumnatriumtartrat	16,0 g/l

► in Milli-Q Wasser lösen (kühl und dunkel lagern)

4.6.2 Qualitative und Quantitative Analysen mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Der qualitative Nachweis von enthaltener FTF-Aktivität aus den ***Bacillus subtilis* Kulturüberständen** sowie den FPLC-Fraktionen aus der Aufreinigung wird mittels der Akzeptorreaktionen mit Galactose und Xylose erbracht. Dazu werden im Reaktionsansatz 0,6 M Saccharose sowie das Akzeptormonosaccharid im doppelten molaren Verhältnis zum Fructosyldonor eingesetzt. Die Reaktion wird mit Überständen aus der stationären Kultivierungsphase in 50 mM Phosphatpuffer pH 5,4 bei 30 °C durchgeführt. Die Probenahme erfolgt in regelmäßigen Abständen. Aufgrund der geringen FTF-Konzentrationen beträgt die Reaktionsdauer bis zu 70 h. Um eine Kontamination durch Mikroorganismen auszuschließen werden den Proben 0,02 % Natriumazid zugesetzt. Dies besitzt nach Remaud-Simeon *et al.* (1994) keinen Einfluss auf die Glycosylierungsreaktion. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 100 °C für 5 min abgestoppt. Die Proben werden 1:40

verdünnt und in 3 µl Aliquots auf DC-Platten aufgetragen (20 x 20 cm Kieselgel [60 Å, F₂₅₄] auf Aluminium mit Konzentrierungszone 20 x 2,5 cm; Fa. Merck).

Der visuelle Nachweis der entstandenen Akzeptor-, Hydrolyse- und Polymerisierungsprodukte erfolgt durch die DC-Trennung der Reaktionsprodukte zwischen der stationären Kieselgelphase und dem Laufmittel I. Die DC-Standards, Saccharose, Galactose, Xylose, Glucose, Fructose, Polysaccharid (Dextran) werden für die Zuordnung in den Konzentrationen 0,05; 0,5; 1,0; 3,0 und 5,0 g/l auf jede Platte aufgetragen.

Für kurze Probenahmezeiten wird eine zehnfach höhere Konzentration an Kulturüberstand als beim qualitativen Nachweis eingesetzt. Die Reaktion erfolgt bei 150 mM Saccharose und dem zweifach molaren Überschuss an Galactose in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 5,4 und 30 °C. Die Proben werden bezogen auf das Saccharid der Nullprobe auf 1 g/l Maximalkonzentration verdünnt.

Für die **rekombinante FTF** wird das Zellextrakt mit je 0,93 U (unter Standardbedingungen: 0,6 M Saccharose in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0, 37 °C) für die Akzeptorreaktion eingesetzt. Der Akzeptor wird der Reaktionslösung in zweifach molarem Überschuss zugefügt. Die FTF-Reaktion wird zeitlich versetzt durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und durch Hitzedenaturierung für 5 min bei 100 °C abgestoppt. Die Reaktionsansätze werden entsprechend des Kalibrierbereiches verdünnt.

Die DC-Standards werden beim quantitativen Nachweis in den Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 1,0 g/l auf jede Platte aufgetragen. Als Standardsubstanzen werden je nach Versuchsdurchführung Saccharose, Galactose, Xylose, Glucose, Fructose und das Polysaccharid Levan eingesetzt. Eine Zuordnung der hydrolytischen und polymerisierenden Eigenschaften der FTF können damit festgestellt werden.

Die Trennung erfolgt generell bei 20 °C und equilibrierter DC-Kammer durch den 3 bis 5-fachen Lauf der mobilen Phase über die Kieselgeltrennphase. Nach jedem Durchlauf (45 - 60 min) werden die DC-Platten unverzüglich durch Warmluft getrocknet. Die separierten Zucker werden durch das DC-Entwicklerreagenz als dunkle Spots sichtbar, indem die DC-Platten durch das Einsenkgerät (Immersion Device III, Fa. Camag) gleichmäßig und schnell eingetaucht und anschließend für 15 min bei 120 °C im Ofen getrocknet werden. Die gefärbten DC-Platten werden mittels Densitometer (GS-800, Fa. Bio-Rad) gescannt und mit der Software Quantity One (Fa. Bio-Rad) verarbeitet. Bei der quantitativen Auswertung kann die mit der Konzentration zunehmende Farbintensität der Spots ermittelt und über eine Boltzmann-Regression (Gleichung 4.2) dem aufgetragenen Standard zugeordnet werden.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - x_0}{dx}}} + A_2 \quad (4.2)$$

Boltzmann-Gleichung: A₁, A₂, x₀ und dx: Regressionsparameter

DC-Laufmittel**Laufmittel I**

Ethylacetat	60,0	% (v/v)
Isopropanol	30,0	% (v/v)
Milli-Q Wasser	10,0	% (v/v)

Laufmittel II

Acetonitril	80,0	% (v/v)
Milli-Q Wasser	20,0	% (v/v)

DC-Entwicklerreagenz

N-(1-Naphtyl)-Ethylendiammonium-dichlorid	0,3	% (w/v)
Schwefelsäure	5,0	% (v/v)

► in Methanol (dunkel lagern)

4.6.3 Quantitative Analyse mittels HPLC

Die Reaktionsproben der nativen sowie rekombinanten FTF werden mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) quantifiziert. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion wird die Probe entsprechend des Standards verdünnt und über Nitrocellulosefilter (0,22 µm, Fa. Millipore) in die HPLC-Gefäße filtriert. Die Trennung erfolgt bei einer Temperierung von 80 °C mit einer RCM Monosaccharid Ca²⁺ Säule (300 x 7,8 mm, Fa. Phenomenex) bzw. einer Sugar SC-1011 Säule (8 x 300 mm, Fa. Shodex) bei einer Durchflussrate von 0,6 - 0,8 ml/min Milli-Q Wasser. Über den Brechungsindex (ERC-7512, Fa. Erma bzw. RI-101, Fa. Shodex) des Durchflusses werden die fraktionierten Saccharide detektiert und mittels der Software Clarity (V 2.6.2.226, Fa. DataApex) dokumentiert und ausgewertet. Neben den verwendeten Edukten enthalten die Standards jeweils auch 1-Kestose (Glu-Fru₂) und 1-Nystose (Glu-Fru₃) im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 8 g/l. Die relative Standardabweichung beträgt 3 %.

4.6.4 Quantitative Analyse mittels HPAEC

Die Reaktionen mit der rekombinanten FTF sowie der β-Fructofuranosidase werden mittels High Performance Anionen-Exchange Chromatographie (HPAEC) analysiert. Das Analysesystem wird mit der Vorsäule CarboPac PA1 (50 x 4 mm, Fa. Dionex) in Kombination mit der Anionentauschersäule CarboPac PA1 (250 x 4 mm, Fa. Dionex) bei 15 °C thermostatisiert betrieben. Die Proben werden entsprechend auf eine Gesamtkohlenhydratkonzentration von 0,1 g/l verdünnt und über einen Nitrocellulosefilter (0,22 µm, Fa. Millipore) filtriert. Die Trennung erfolgt bei einer Durchflussrate von 1,0 ml/min bei einem zeitlich gesteuerten Gradienten von Natriumacetat in der mobilen Phase. Dabei wird die mobile Phase vor dem Eintritt in das System entgast, um störenden Sauerstoff zu

entfernen. Die Probenauftrennung erfolgt in einem NaOH-Gradienten. Die Kohlenhydrate werden durch einen gepulsten, amperometrischen Detektor über die Software Clarity (V 2.6.2.226, Fa. DataApex) detektiert und ausgewertet. Die Verstärkung des Detektors liegt bei 300, so dass für den eingestellten Kalibrierungsbereich 0,01 bis 0,1 g/l die Messsignale bis maximal 400 mV detektiert werden.

Gradienten-Programm HPAEC

Zeit (min)	0 - 5	5 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 37	37 - 60
Elutionslösung (%)	0	0 → 25	25 → 50	50	50 → 0	0

HPAEC-Lösungen

Laufmittel

NaOH 0,1 M

Elutionsmittel

NaOH 0,1 M

Natriumacetat 1,0 M

► in Milli-Q Wasser

4.7 Physikalische und chemische Charakterisierung der Reaktionsprodukte

4.7.1 Schmelzpunktbestimmung

Die lyophilisierte Reinstprobe wird auf den Objektträger des Melt-Temp 2 Mikroskopes (Model 1002, Fa. Barnstedt International) aufgetragen und im linearen Temperaturprofil des Ofens der Schmelzpunkt bestimmt.

4.7.2 Massenspektrometrie mittels Elektrospray Ionisierung (ESI/MS)

Die Reinstproben werden in Methanol gelöst und mittels Elektrosprayverfahren im MAT 8340 (Fa. Finnigan) unter Atmosphärendruck ionisiert (NMR-Laboratorium des Institutes für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig). Diese schonende Methode zur Ermittlung der molekularen Masse eignet sich besonders für Biomoleküle, da es kaum zur störenden Fragmentierung kommt.

4.7.3 Bestimmung der optischen Aktivität

Die optische Drehung monochromatischen Lichtes wird im Sucromat Polarimeter (Fa. Dr. Kernchen GmbH) durchgeführt.

4.7.4 Kohlenhydratanalyse durch Kernspinresonanz-Spektren (NMR-Spektren)

Für die NMR-Analyse werden 30 - 50 mg der lyophilisierten Reinstprobe in 0,8 ml deuteriertem Wasser gelöst. Die NMR-Spektren werden mit einem Kernspinresonanz-Spektrometer AM 400 (Fa. Bruker) bei 400 MHz für ^1H - und 100 MHz für ^{13}C -NMR-Spektren

und wenn erforderlich, mit einem AV2 600 (Fa. Bruker) bei 600 MHz für ^1H - und 150 MHz für ^{13}C -NMR-Spektren bei 38,8 °C im Standard-Pulsprogramm aufgezeichnet (NMR-Laboratorium des Institutes für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig). Die Daten werden mit der Software XWINNMR (Fa. Bruker) analysiert. Die relative chemische Verschiebung durch D_2O wird durch δ_{H} 4,73 und δ_{C} 75,67 entsprechend berücksichtigt. Die Auswertung erfolgt durch Prof. Dr. J. Seibel, Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg.

4.8 Optimierung des Produktionsprozesses zur Gewinnung der extrazellulären Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

Die Kultivierungsbedingungen werden hinsichtlich einer Steigerung volumetrischer Aktivitäten an sekretierter FTF optimiert, wobei die Einflüsse von Medienbestandteilen sowie Kultivierungsbedingungen in Schüttelkolben- sowie Bioreaktorkultivierungen untersucht werden.

4.8.1 Optimierung Medien Schüttelkolbenkultivierung

Für die Schüttelkolbenkultivierungen werden 50 ml Vorkultur für 24 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Die Hauptkultivierungen werden mit je 0,012 g/l Biotrockenmasse aus diesen Vorkulturen beimpft. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei 580 nm. Bei der Vorkultur wird der pH der Hauptkultur berücksichtigt, um eine Wachstumsverzögerung durch eine Adaption an die Milieubedingungen zu vermeiden. Die weiteren Ansätze werden mit einer nach S3 durchgeführten Vorkultivierung angeimpft (S6 bis S15).

Die Kultivierungen werden wie in der Tab. 4.8.1 angegeben mit 200 ml Medienvorlage bei 150 rpm im Schüttelinkubator durchgeführt. Die Probenahme erfolgt in regelmäßigen Abständen über die Kultivierungsdauer. Dazu werden 3 ml der Zellsuspension entnommen und für 10 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Es wird die Biotrockenmasse, die optische Dichte und die FTF-Aktivität analysiert. Als Referenz wird der Ansatz S3 verwendet.

Die Messwerte der optischen Dichte (OD_{580}) und der Biotrockenmasse (BTM) stehen in linearen Zusammenhang (Gleichung 5.1).

$$\text{BTM [g/l]} = (0,30311 \pm 0,0077) \cdot \text{OD}_{580} \quad (5.1)$$

Aufgrund geringerer Fehlerabweichungen wird die Biotrockenmasse aus der optischen Dichte abgeleitet.

Für die Kulturen zur Variation des C/N-Verhältnisses (S9 bis S15) wird die von Dauner *et al.* (2001) festgestellte die Elementarzusammensetzung von *Bacillus subtilis* mit 52 % Kohlenstoff und 13,9 % Stickstoff angenommen. Es wird eine vollständige Verwertung der Saccharose bzw. die Verwertung des von der FTF freigesetzten Glucoseanteils

berücksichtigt. Dies beinhaltet den Entzug des Fructoseanteils durch eine Levanbildung. Die N-Einwaage wird auf das oben angegebene C/N-Verhältnis von 3,74 angepasst.

Tab. 4.8.1: Medienoptimierung für die Schüttelkolbenkultivierung. Abweichungen von den Kultivierungsparametern und Medienbestandteilen nach Jayasuriya (1955, Kapitel 4.4.3) sind dick hervorgehoben

Ansatz	Saccharose [g/l]	(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/l]	Hefeextrakt [g/l]	pH	Temperatur [°C]	Aerob / Anaerob
S1	10,0	0,5	-	5,0	37,0	aerob
S2	10,0	0,5	-	6,0	37,0	aerob
S3	10,0	0,5	-	7,0	37,0	aerob
S4	10,0	0,5	1,0	5,0	37,0	aerob
S5	10,0	0,5	1,0	6,0	37,0	aerob
S6	10,0	0,5	1,0	7,0	37,0	aerob
S7	10,0	0,5	-	7,0	34,0	aerob
S8	10,0	0,5	1,0	7,0	34,0	aerob
S9	20,0	1,00	-	7,0	34,0	aerob
S10	20,0	1,00	1,0	7,0	34,0	aerob
S11	10,0	0,5	1,0	7,0	34,0	anaerob
S12	25,0	12,4	-	7,0	37,0	aerob
S13	25,0	6,2	-	7,0	37,0	aerob
S14	35,0	17,4	-	7,0	37,0	aerob
S15	35,0	8,7	-	7,0	37,0	aerob

4.8.2 Bioreaktor-Kultivierung von *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

Die Kultivierungsversuche werden mit vier parallel betriebenen Kleinfermentern des Biostat Q Systems (Fa. B. Braun Biotech International) unter den Kultivierungsbedingungen in Tab. 4.8.2 durchgeführt. Durch eine gezielte online Steuerung der Rührerdrehzahl wird der Sauerstoffpartialdruck pO₂ bei dem Ansatz B1, B2 und B4 geregelt. Die Rührerdrehzahl für den Ansatz B3 wird in Analogie zum Wachstumsverlauf der Schüttelkolbenkulturen konstant bei 150 rpm gehalten. Die Sauerstoffzufuhr wird durch die Luftbegasung mit 1,0 vvm gewährleistet. Die Steuerung des pH-Wertes mit 2,5 Mol NaOH (max. Durchflussrate 2 ml/min) ermöglicht die Kultivierung bei konstant neutralem pH. Der pH-Shift in Ansatz B2 nach 8 h Kultivierungsdauer wird über die natürliche Akkumulation saurer Stoffwechselprodukte erreicht. Jeder Ansatz wird über den Doppelmantel des Reaktorgefäßes thermostatisiert. Schaumbildung wird durch die manuelle sterile Zugabe von Antischaummittel (10 % (v/v) Ucolub N115, Fa. Fragol Schmiermittelindustrie GmbH) nach Bedarf unterdrückt.

Tab. 4.8.2: Fermenterkultivierung: Abweichungen von den Kultivierungsparametern und Medienbestandteilen nach Jayasuriya (1955, Kapitel 4.4.3) sind dick hervorgehoben.

Ansatz	Saccharose [g/l]	(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/l]	pH- Regelung	Temperatur [°C]	Rührerdrehzahl [rpm]	pO ₂ - Sollwert
B1	20,0	0,9	7,0	37,0	150 - 1500 (abh. vom pO ₂)	100 %
B2	20,0	0,9	7,0 → 6,0 (nach 8 h)	42,0	150 - 1500 (abh. vom pO ₂)	100 %
B3	20,0	0,9	7,0	37,0	150	keine Regelung
B4	20,0	2,7	7,0	37,0	150 - 1500 (abh. vom pO ₂)	100 %

Die Bioreaktorkultivierungen mit je 0,012 g/l Biotrockenmasse mit einer Medienvorlage von 400 ml beimpft. In regelmäßigen Abständen werden 5 ml Proben der Bakterienkultur abgezogen und für 10 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Die Biotrockenmasse, optische Dichte sowie die FTF-Aktivität werden über die Kultivierungsdauer analysiert.



Abb. 4.8.1: von links nach rechts: Kultivierung B1, B2, B3 und B4

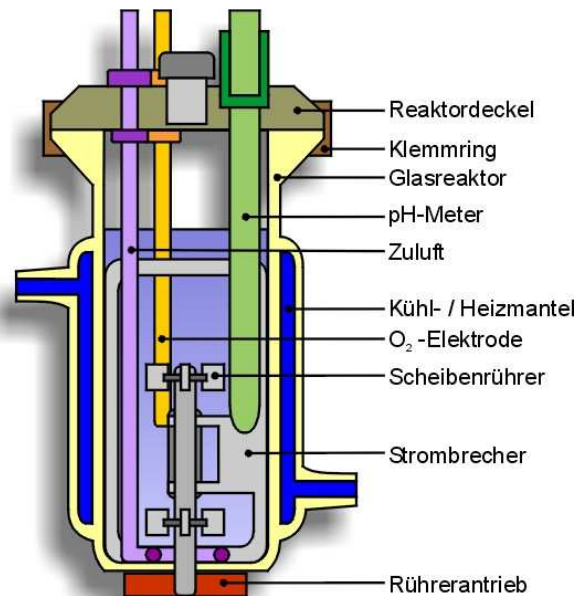


Abb. 4.8.2: schematische Darstellung des Einzelfermenters

4.9 Optimierung zur Herstellung und Aufreinigung der rekombinanten Fructosyltransferase

4.9.1 Expressionsoptimierung durch Anpassung des Codon Adaptation Index

Ein Ansatz zur Expressionsoptimierung für die Steigerung der Translationseffizienz bietet die Codon-Anpassung der Gensequenz auf die in *E. coli* hauptsächlich genutzten Codons. Dies soll bei der Überexpression des Fremdgens t-RNA-Limitationen und die daraus resultierenden Translationsabbrüche reduzieren.

Es wird eine CAI-Anpassung mit JCat (Java Codon Adaption Tool) nach Grote *et al.* (2005) durchgeführt. JCat ändert die DNA-Sequenz unter Nutzung häufig verwendeter Codons, Vermeidung von Restriktionsschnittstellen, Anpassung des GC-Gehaltes und einer Rho-unabhängige Transkriptionsterminatorstruktur in *E. coli*.

4.9.2 Expressionstemperatur zur Optimierung der recFTF_{Strep} Ausbeute

Die Expressionsausbeuten der recFTF_{Strep} werden durch eine Anpassung der Kultivierungstemperatur auf einen optimalen Erntezeitpunkt bestimmt. Die Vorkultur und die Kultivierungen werden im Schüttelkolben entsprechend Kapitel 4.4.4 durchgeführt. Nach der Induktion wird die Temperatur auf 28 °C gesenkt, um den Einfluss auf die Bildung von aktiver löslicher und inclusion body gebundener recFTF_{Strep} zu untersuchen.

4.9.3 Bioreaktorkultivierung zur Produktion von recFTF_{Strep}

Die Bioreaktorkultivierung wird im Kleinfärmer Minifors (Fa. Infors HAT) in LB-Medium bei pH 7,0, 37 °C und einer konstanten Rührerdrehzahl von 500 rpm durchgeführt. Es erfolgt eine Luftbegasung mit 1,0 vvm. Beimpft wird mit 1 % (v/v) Übernachtskultur von *E. coli* Rosetta recFTF_{Strep}. Das Wachstum wird online über den Sauerstoffpartialdruck überwacht. Die Induktion erfolgt mit Tetraanhydrozyklin. Proben werden stündlich auf OD, BTM sowie die Proteinkonzentration und Aktivität des Überstandes und der inclusion body Fraktion untersucht. Durch die manuelle sterile Zugabe von 2 M HCl wird ein basischer pH reguliert bzw. eine Schaumbildung durch Zugabe von Antischaummittel (10 % (v/v) Ucolub N115, Fa. Fragol Schmiermittelindustrie GmbH) unterdrückt.

4.9.4 Untersuchungen zum Agglomerationionsverhalten

Für die Untersuchungen zur Agglomeration wird das FTF-haltige Dialysat mittels Querstromfiltration auf 4 mg_{FTF}/ml konzentriert.

4.9.5 Renaturierungsverhalten gelöster recFTF inclusion bodies

Eine gesättigte Proteinlösung mit 75 mg_{IB}/ml_{Harnstoff-Puffer} wird mit 8 M Harnstofflösung auf 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg_{IB}/ml_{Harnstoff-Puffer} verdünnt. Die Dialyse erfolgt gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0).

4.9.6 Zellaufschluss mit Zusatz von DNase / Lysozym

Die Aufschlussproben werden mit dem jeweiligen Puffer auf 43 g/l BTM eingestellt. Es werden 50 mM Phosphatpuffer, Lysispuffer (s.u.) in Vergleich zu kommerziellem Puffer (IBAllys Bacterial Lysis Puffer, Fa. IBA) mit und ohne DNase- bzw. Lysozymzusatz untersucht. Die Zusätze werden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Im Vergleich zu den unbeanspruchten Proben werden zwei Ultraschallaufschlüsse mit je 4 min durchgeführt und die Proben auf Proteingehalt und FTF-Aktivität untersucht.

Lysispuffer

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
NaCl	100 mM
Igepal CA 630	0,05 % (v/v)
EDTA	1,0 mM

4.10 Methoden zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter

4.10.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Fructosyltransferaseaktivität ergibt sich aus der Linearität der initialen Glucose-Freisetzungsrate zur Reaktionszeit (dc_{Glu}/dt). Die Ermittlung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit (v_0) beinhaltet den Vorteil, dass bei definierten Reaktionsbedingungen der Einfluss von Nebenreaktionen, Reaktionshemmungen und -aktivierungen eliminiert oder konstant ist (Lasch, 1987).

Die Einheit Unit (U) wird als diejenige Enzymmenge definiert, welche die Bildung von 1 μ mol Glucose in einer Minute katalysiert. Aus der FTF-Reaktion resultiert eine äquimolare Freisetzung an Glucose im Verhältnis zur Produktbildung.

Die volumetrische Aktivität ergibt sich aus Gleichung 4.3:

$$A_{vol} = \frac{dc_{Glu}}{dt} \cdot \frac{V_{Enzymlösung} + V_{Substratlösung}}{V_{Enzymlösung}} \quad (4.3)$$

Die Aktivität wird unter Standardbedingungen gemessen (Tab. 4.8.1). Die Versuche werden als Doppelbestimmung durchgeführt. Es erfolgt eine regelmäßige Probenahme. Die Reaktion wird durch Hitzedeaktivierung (5 min bei 100 °C) oder die Zugabe von 0,1 M NaOH gestoppt. Bei beiden Stopmethoden wird keine Glucose durch Hydrolyse des Substrates freigesetzt.

Bei den Suc1-Versuchen werden jeweils 100 g/l Saccharoseanaloga als Substrat eingesetzt. Die konzentrierte Suc1-Enzymlösung wird 1:200 und die Negativkontrolle (*Aspergillus niger* AB 1.13 mit SKANIp8 kultiviert mit Glucose) 1:20 verdünnt.

Tab. 4.10.1: Standardversuchsbedingungen zur Bestimmung der Aktivität. Sac: Saccharose, Gal: Galactose, Puffer: Phosphatpuffer

Stamm	Enzym	Substrat [mol/l]	Temperatur [°C]	pH [-]	Puffer [mmol/l]	Analysemethode
<i>B. subtilis</i> NCIMB 11871	FTF	0,3 / 0,6 (Sac / Gal)	30	6,0	50	DC / Biorad Desitometer
<i>E. coli</i> BL21	recFTF _{His}	0,5 (Sac)	37	6,0	50	HPLC, HPAEC
<i>E. coli</i> Rosetta	recFTF _{Strep}	0,5 (Sac)	37	6,0	50	HPLC, HPAEC
<i>A. niger</i> AB1.13	Suc1	0,15 (Sac)	40	5,4	50	HPAEC

4.10.2 Bestimmung der Ausbeute, Umsatz und Selektivität

Die Güte einer Reaktion wird in Bezug auf die vollständige Umsetzung des Eduktes zu einem Produkt im Verhältnis zu den tatsächlich gemessenen Mengenverhältnissen beurteilt.

Dabei ergibt sich unter Berücksichtigung der Stöchiometrie die Ausbeute (Y_P) aus dem Verhältnis der entstandenen Produktmenge (P) zur eingesetzten Menge der reaktionslimitierenden Eduktkomponente (k) (Gleichung 4.4).

$$Y_P = \frac{n_P - n_{P,0}}{n_{k,0}} \cdot \frac{|\vartheta_k|}{\vartheta_P} \quad (4.4)$$

Der Umsatz X_i betrachtet die Menge des umgesetzten Eduktes im Verhältnis zur initial eingesetzten Eduktmenge (Gleichung 4.5)

$$X_i = \frac{n_{i,0} - n_i}{n_{i,0}} \quad (4.5)$$

Die Selektivität leitet sich aus dem Quotient von Ausbeute und Umsatz ab (Gleichung 4.6). Diese beschreibt somit unter Beachtung der stöchiometrischen Koeffizienten den Anteil des insgesamt umgesetzten Eduktes in das Zielprodukt (Aust und Bittner, 2011).

$$Y_P = X_k \cdot S_p \quad (4.6)$$

4.10.3 Bestimmung des pH-Optimums

Der Einfluss des pH wird mit dem Substrat Saccharose ermittelt. Die Enzymreaktion für die FTF aus *Bacillus subtilis* wird bei 37 °C in 50 mM Phosphatpuffer und 500 mM Saccharose

bei den pH-Werten 5,0; 5,2; 5,4; 5,7; 6,0; 6,3; 6,7; 7,0 und 8,0 durchgeführt. Für die Suc1 aus *Aspergillus niger* wird die Reaktion in 50 mM Phosphatpuffer bei 40 °C und 146 mM Saccharose bei den pH-Werten 5,0; 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,4; 6,8 und 7,2 durchgeführt.

Phosphatpuffer nach Sørensen

pH-Wert	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,4	6,8	7,0	7,2	8,0
KH ₂ PO ₄ (% v/v)	99,2	98,4	97,3	95,5	92,8	88,9	75,4	53,4	41,3	29,6	3,7
Na ₂ HPO ₄ (% v/v)	0,8	1,6	2,7	4,5	7,2	11,1	24,6	46,6	58,7	70,4	96,3

4.10.4 Bestimmung des Temperaturoptimums und der Temperaturstabilität

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgt für die FTF aus *Bacillus subtilis* bei pH 6,0 mit 500 mM Saccharose und für die Suc1 aus *Aspergillus niger* bei pH 5,4 mit 146 mM Saccharose in jeweils 50 mM Phosphatpuffer. Die Enzymaktivität wird bei der FTF für die Temperaturen 30; 34; 37; 42; 48; 55 und 60 °C und bei der Suc1 für 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 70 und 80 °C untersucht.

Die Temperaturstabilität wird durch die Vorinkubation der Enzymlösung bei unterschiedlichen Temperaturen gewährleistet und der Einfluss auf die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bei Standardbedingungen untersucht (Kapitel 4.10.1). Die FTF wird bei 37; 45; 55 °C für 0,5; 1; 2; 4; 6 h und die Suc1 bei 30; 40; 50 °C für 1; 3; 6; 12 h vorinkubiert.

4.10.5 Einfluss von freien Ionen auf die Enzymaktivität der recFTF_{Strep}

Hinsichtlich der in den Immobilisierungsträgern enthaltenen Ionen wird der Einfluss der Ionen auf die Transferaseaktivität untersucht. Dem Standardreaktionsansatz mit 0,5 M Saccharose werden die Salze KCl, MgCl₂, KAl(SO₄)₂, FeSO₄, FeCl₂, FeCl₃, CaCl₂ und EDTA in 1 und 10 mM Konzentration zugegeben. Die recFTF_{Strep} wird in einer Konzentration von 0,52 mg_{FTF}/ml eingesetzt.

4.11 Immobilisierung der rekombinanten Fructosyltransferase

4.11.1 Adsorption an Bentonit

Die Herstellung des konditionierten Natrium-Bentonits erfolgt nach Nowikow (1995) zunächst durch Hydratisierung von 12 g trockenem Bentonit in 300 ml Milli-Q Wasser. Die Zugabe von 120 ml von 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid und anschließende Temperierung unter Rühren für 6 h auf 70 °C oxidiert organische Verunreinigungen. Das Bentonit wird bei 10000 g für 10 min abzentrifugiert. Diese Behandlung wird dreimal wiederholt. Das Pellet wird anschließend in 300 ml 1,0 M NaCl Lösung aufgenommen, ein pH von 6,0 mit HCl eingestellt und unter Rühren 24 h bei 20 °C inkubiert. Der Vorgang wird mit frischer NaCl-Lösung 5 mal wiederholt und das Bentonit anschließend in 0,05 M NaCl bei 4 °C gelagert.

Das Bentonit wird in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) resuspendiert. Unbehandeltes Bentonit wird in einer Konzentration von 1,95 g/l und konditioniertes Na-Bentonit 3,38 g/l eingesetzt.

Es werden jeweils 2,0 ml in die Reaktionsgefäße gegeben und für 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 2,0 ml unterschiedlich konzentrierter Proteinlösungen resuspendiert und für 24 h bei 4 °C im Rotator inkubiert. Zur Adsorption werden die Fraktionen der IB-recFTF_{Strep} eingesetzt, welche durch Querstromfiltration aufkonzentriert wurden. Ausgehend von einer Proteinkonzentration von 3,3 g_{FTF}/l wird diese 1:1,5, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64 verdünnt, so dass sich unterschiedliche Massenkonzentrationsverhältnisse von Träger zu Enzym ergeben. Für Bentonit ist das 55,7:1 bis 0,6:1 und für Na-Bentonit 96,6:1 bis 1:1. Das Immobilisat und dessen Überstand werden jeweils gegen die Referenzprobe der entsprechenden FTF-Verdünnung auf Proteingehalt und Aktivität untersucht. Das abzentrifugierte Bentonit wird in Puffer resuspendiert und wieder 24 h bei 4 °C inkubiert. Der Überstand des Waschschruttes sowie das erneut resuspendierte Bentonit werden auf Proteingehalt und Aktivität untersucht. Die Immobilisierung wird im Doppelansatz durchgeführt.

Die Resuspendierung bei den Waschschrutten erfolgt durch Ultraschall bei konstanter Kühlung auf Eis. Für die adsorbierte recFTF hat sich diese Methode als geeignet herausgestellt, da auch für längere Behandlungsdauern kein relevanter Einfluss auf die trägerfixierten Proteinkonzentrationen und Enzymaktivitäten festgestellt wird.

4.11.2 Adsorption an Hydroxylapatit

Das Hydroxylapatit (Typ 1) wird in einer Konzentration von 4,7 g/l in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0 eingesetzt. Die Adsorption wird entsprechend den Versuchen mit Bentonit durchgeführt, so dass sich ausgehend von 3,3 g_{FTF}/l Massenkonzentrationsverhältnisse von zwischen 134,3:1 bis 1,4:1 ergeben.

4.11.3 Kovalente Anbindung an Eupergit C

Eupergit C (Fa. Röhm, Darmstadt) wird mit einer Konzentration von 10,0 g/l analog zu den Versuchen mit Bentonit in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) bei Enzymverdünnungen mit einem Verhältnis von 238,1:1 bis 3,3:1 Massenkonzentration eingesetzt. Die Eupergit-Enzymlösungen werden für 96 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Das Immobilisat wird anschließend über eine Nitrocellulosemembran (12 µm) abfiltriert.

4.11.4 Einschluss in eine Alginatmatrix

Aus dem Natriumsalz der Alginsäure wird mit 25 mM NaAc-Puffer eine wässrige Alginatlösung (3,0 % m/v) angesetzt und für mindestens 12 h bei 4 °C homogenisiert. Die Freisetzung des Enzyms aus dem Träger wird durch Quervernetzung mittels Glutaraldehyd nach Li *et al.* (2007) verhindert. Für die erste Quervernetzung wird die Alginatlösung mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd versetzt und mit dem gleichen Volumen recFTF-Lösung (0,5 mg/ml) für 30 min bei 4 °C gerührt. Für die ionotrope Gelierung wird die Lösung mit der Immobilisationsapparatur (Abb. 4.11.1) in eine 200 mM CaCl₂-Lösung (4 °C, pH 5,4) getropft und für weitere 60 min zur Aushärtung in frischer CaCl₂-Vernetzerlösung gerührt.

Für die zweite Quervernetzung wird das Immobilisat für 2 h in 0,025 % (v/v) Glutaraldehyd-Lösung gerührt.

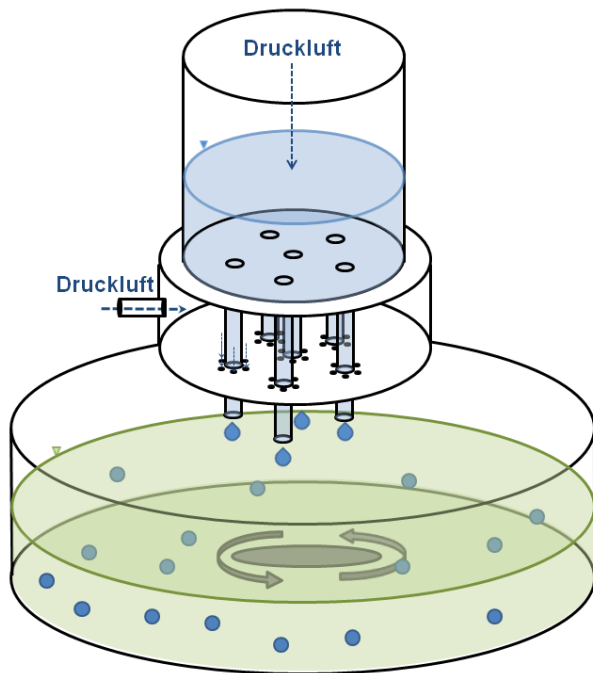


Abb. 4.11.1: Immobilisierungsapparatur für den Matrixeinschluss mit Alginat.

4.11.5 Integration der Adsorption bei der FTF-Renaturierung

Die Rückfaltung der resolubilisierten FTF erfolgt durch Dialyse. Dabei führt die Ausbildung von Proteinniederschlag zu Verlusten des theoretisch verfügbaren Biokatalysators. In den Proben liegen nur geringe Konzentrationen an löslicher FTF vor. Durch den Entzug rückgefalteter recFTF aus dem Renaturierungsprozess soll die Ausbeute an aktivem Katalysator erhöht werden.

Für die Adsorption an die Trägermaterialien Bentonit und Hydroxylapatit wird Resolubilisat mit den Proteinkonzentrationen 1,39 g/l und 0,42 g/l eingesetzt. Die FTF-Träger-Verhältnisse werden analog zu den Immobilisierungsversuchen gewählt, um Vergleiche zu den Adsorptionsisothermen mit der bereits renaturierten freien recFTF herstellen zu können. Es werden 6,9 g/l Bentonit bzw. 8,0 g/l Hydroxylapatit im Träger-Enzym-Verhältnis 16,4:1 und 5,0:1 bzw. 15,7:1 und 4,7:1 eingesetzt. Desweiteren werden im dreifachen Ansatz 17,4 mg_{FTF}/ml mit 6,6 g/l Hydroxylapatit versetzt (Verhältnis 0,4:1). Je 1 ml des Resolubisates wird mit dem Adsorbens versetzt und in eine Dialysekammer überführt. Als Referenz wird Resolubilisat ohne Zusatz von Adsorbens eingesetzt.

Die Dialysekammer befindet sich in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Abb. 4.11.2), welches luftblasenfrei mit 50 mM Phosphatpuffer gefüllt wird. Im Verlauf der Dialyse (20 h, bei 20 °C) wird der Puffer 6 mal ausgetauscht. Über die semipermeable Membran im Deckel der Kammer werden das Protein und das Adsorbens zurückgehalten. Die Durchmischung der Proben wird durch Rotation gewährleistet.

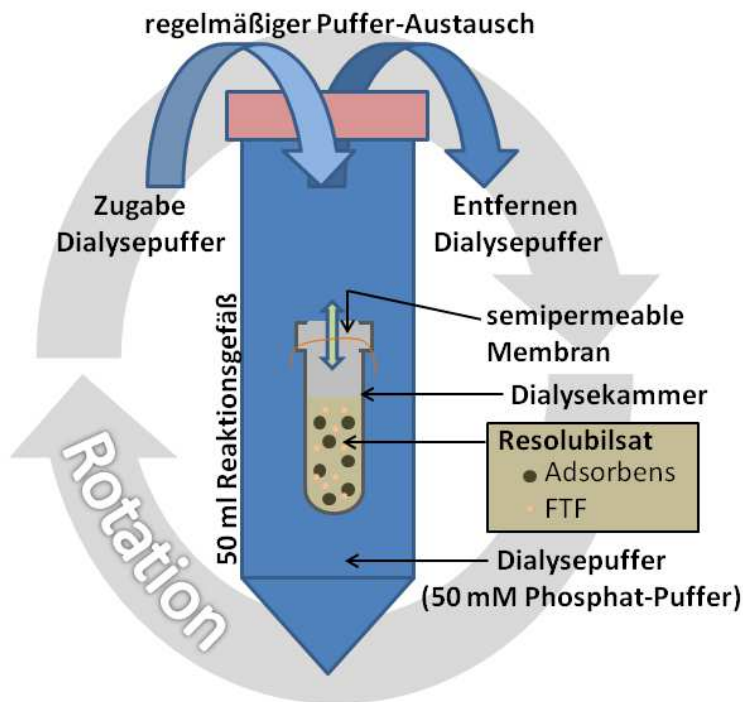


Abb. 4.11.2: Versuch zur Adsorption der recFTF_{Strep} während der FTF-Renaturierung.

Nach der Dialyse werden sowohl die Eigenschaften des Protein-Dialysats (= ohne Träger, mit Proteinniederschlag) als auch die des Adsorbens-Dialysats (mit Bentonit oder Hydroxylapatit als Träger) untersucht. Die Überstände der Proben werden durch Zentrifugation für 10 min bei 15000 g gewonnen. Das Immobilisat wird gegen die Referenzprobe der entsprechenden FTF-Renaturierung auf Proteingehalt und Aktivität untersucht. Für die Dialysate werden der Trockensubstanzgehalt und für die Überstände die Proteinzusammensetzung im SDS-Gel ermittelt.

4.12 Physikochemische Charakterisierung der Adsorbentien Bentonit und Hydroxylapatit

Unbehandeltes Bentonit, konditioniertes Na-Bentonit und Hydroxylapatit werden hinsichtlich ihrer Struktur und Zusammensetzung untersucht. Die zur Immobilisierung eingesetzten Adsorbentien liegen in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) vor. Zur Herstellung der Trockensubstanzproben werden diese zunächst zweimal in Milli-Q Wasser gewaschen und anschließend bis zur Gewichtskonstanz lyophilisiert.

4.12.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die lyophilisierten Adsorbentien werden auf den Graphit-Probenteller aufgetragen und im Vakuum mit Gold beschichtet (Fa. Bal-Tec, Balzers SCD 050). Die Trägeroberflächen können durch die Detektion emittierender Elektronen hochauflösend im Rasterelektronenmikroskop (Fa. Jeol, JSM-6400) dargestellt werden.

4.12.2 Elementverteilung der Trägermaterialien

Das Rasterelektronenmikroskop ermöglicht durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDS System) die Darstellung der elementaren Zusammensetzung. Es werden pro Probe Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.12.3 Elementaranalyse der Trägermaterialien

Der Anteil und die Zusammensetzung organischer Komponenten wird für das Rohmaterial Bentonit durch die Elementaranalyse mit dem VarioMicro Cube (Fa. elementar, V3.1.1) im CHNS-Modus verifiziert.

4.12.4 Thermogravimetrische Analyse

Der Anteil der Restfeuchte, des Zwischenschichtwassers und der organischen Komponenten wird durch die thermogravimetrische Analyse (Fa. Mettler Toledo, TGA/DSC 1) für 25 - 950 °C Probertemperatur mit einer Heizrate von 10 °C/min durchgeführt. Die Analyse erfolgt in Luft- und in Stickstoffatmosphäre, um durch die Oxidation organische Komponenten des unbehandelten und konditionierten Bentonits zu quantifizieren.

4.12.5 Größenbestimmung der Oberfläche durch BET-Messung

Die BET-Messung wird mit der Nova Station A (Fa. Quantachrome Instruments) durchgeführt. Zur Ermittlung der Adsorptionsisothermen werden die Messdaten im Multipoint-Verfahren mit der Software NovaWin 2 (Version 9.0) ausgewertet. Nach der Äquilibrierung (90 min) bei -195,8 °C werden die Proben für 140 min mit Stickstoff begast und die Messpunkte aufgenommen.

4.12.6 Ermittlung der Partikelgrößenverteilung im Laserbeugungsspektrometer

Die Adsorbentien werden in Milli-Q dispergiert und für 30 s mit Ultraschall behandelt. Die Partikel erzeugen entsprechend der Partikelgrößenverteilung ein charakterisiertes Beugungsmuster im monochromatischen Lichtgang des Laserbeugungsspektrometers (Fa. Sympatec, Helos). Die Verteilung wird über den Messbereich von 0,1 - 100 µm erfasst.

Zur Darstellung der Partikelgrößenverteilung wird das Volumen der Partikel herangezogen, so dass sich der Verteilungsbereich in diskrete Massenintervalle unterteilt. Die Verteilungssummenkurve $Q_3(x)$ ergibt sich aus der Aufsummierung der Massenintervalle in Bezug auf die Gesamtmasse der Probe. Der Verteilungsdichtewert $q(x)$ ergibt sich aus der Ableitung der Summenverteilung und ist damit der Mengenanteil eines gegen Null strebenden Partikelgrößenintervalls $(x, x + dx)$ in Bezug auf die Intervallbreite (Gleichung 4.7).

$$q_3(x) = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta Q_3}{\Delta x} = \frac{dQ_3(x)}{dx}$$

(4.7)

Der Äquivalentdurchmesser x liegt beim Mengenanteil ΔQ_3 damit zwischen einer minimalen und maximalen Partikelgröße (Gleichung 4.8). Die Fläche der Verteilungsdichte ist damit der normierten Summenverteilung gemäß 1.

$$\int_{x_{\min}}^{x_{\max}} q_3(x) dx = Q_3(x_{\max}) - Q_3(x_{\min}) = 1 \quad (4.8)$$

Der Median x_{50} bezeichnet die Partikelgröße x , welche dem Wert von 0,5 der Verteilungssummenkurve Q_3 zugeordnet wird. Der Median bietet neben der Verteilungsdichte und dem mittleren Partikeldurchmesser einen wichtigen Kennwert zur Charakterisierung von Partikelgrößenverteilungen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die regio- und stereospezifische Biokatalyse ermöglicht eine einfache Gewinnung von hochwertigen Oligosacchariden aus kostengünstigen, nachwachsenden Rohstoffen, wie Saccharose. Die Oligosaccharidsynthese wird für die Fructosyltransferase SacB aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 und die β -Fructofuranosidase Suc1 aus *Aspergillus niger* AB1.13 untersucht.

5.1 Optimierung der Aktivitätsausbeute der FTF bei Kultivierungen von *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

Für die effektive Nutzung der mikrobiellen Stoffwechselleistung bei der Proteinbiosynthese müssen die Kultivierungsparameter sowie die Medienzusammensetzung optimal auf die Sekretion der FTF abgestimmt werden.

Die *sacB*-spezifische Sekretion gewährleistet die optimale Funktion des gereiften Enzyms, die nach Daguer *et al.* (2005) auch als starkes Expressionssystem für die Sekretion rekombinanter Proteine verwendet werden kann. Die extrazelluläre Expression der FTF in *Bacillus subtilis* beinhaltet durch die Abgrenzung zu den intrazellulären Proteinen eine Anreicherung in hoher Reinheit. Jedoch liegt das Enzym in äußerst geringen Konzentrationen vor, so dass eine Aufarbeitung großer Volumina an Kultivierungsüberstand nötig ist.

5.1.1 Kultivierungsoptimierung in statischer Schüttelkolbenkultur

Der pH-Wert, der Zusatz von Hefeextrakt, die Kultivierungstemperatur sowie das eingesetzte C/N-Nährstoffverhältnis werden in Bezug auf die FTF Sekretion untersucht. Als Referenz dient der Standardansatz nach Jayasuriya (1955). Baciú (2005) zeigt für die FTF, 10 - 12 h nach exponentiellen Phase, ein FTF-Konzentrationsmaximum auf. Die Kultivierung wird daher auch für die stationäre Phase erfasst.

Bei der Kultivierung tritt eine teils starke Pigmentierung auf (Abb. 5.1.1). In der stationären Phase bilden sich zunehmend schwarze Pigmente.



Abb. 5.1.1: Pigmentierung der Schüttelkolbenkultur nach 26 h Kultivierung.

Dunkel pigmentierte Kulturen weisen eine besonders hohe FTF-Aktivität auf. Saccharose induziert die FTF-Sekretion und dient zudem als einzige C-Quelle. Die FTF bildet Levan setzt dabei Glucose frei, welche vom Bakterium schnell assimiliert wird. Der Verbrauch der Saccharose beendet die exponentielle Wachstumsphase und induziert eine Sporenbildung. Die Sporen enthalten dabei das Pigment.

Nach Rogolsky (1968) entstehen die schwarzen melaninähnlichen Pigmente in längeren Kultivierungen durch Sporulation, welche in der Stärke von der Mn^{2+} -Konzentration abhängt. $MnSO_4$ ist in den Spurenelementen des Mediums enthalten. Bei *Bacillus subtilis* 168 zeigt sich besonders für alkalische pH-Werten eine Bildung von braunem, melaninähnlichen Sporenpigment, welches dem Organismus zum Schutz vor Oxidantien und UV-Strahlung dient (Hullo *et al.*, 2001; Riesenman und Nicholson, 2000).

Bei vitalen Zellen fällt die Färbung entsprechend der Zelldichte unterschiedlich hoch aus. Im späteren Kultivierungsverlauf werden durch die Pigmentierung zunehmend Abweichungen zu leicht erhöhten optischen Dichten festgestellt.

5.1.1.1 Kultivierungseinfluss pH-Wert

Der pH des Kulturmediums spielt bei *Bacillus subtilis* hinsichtlich der Induktion morphologischer Veränderungen und bei der Enzymsekretion eine wichtige Rolle (Asghera *et al.*, 2007). Ein pH < 6,0 wirkt wachstumsinhibierend und es werden lange, teilweise polar verbundene Stäbchen mit verminderter Mobilität gebildet. Mit steigendem pH bilden sich deutlich weniger Zellaggregate aus und die Beweglichkeit der Einzelzellen steigt (Abb. 5.1.2).

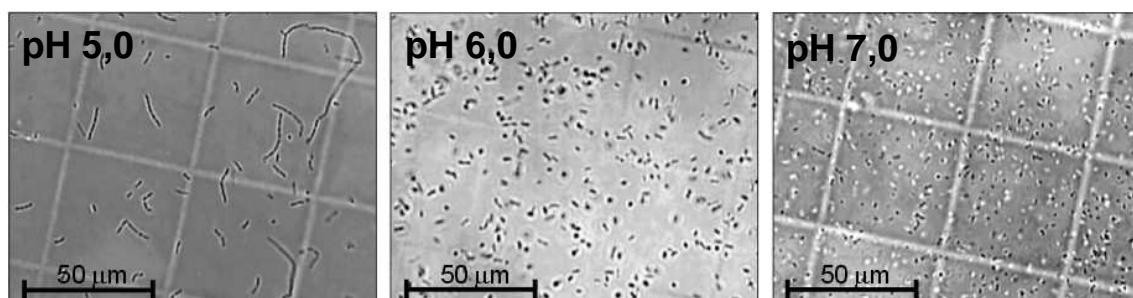


Abb. 5.1.2: Zellmorphologie in Abhängigkeit vom Kultivierungs-pH-Wert.

Ein neutraler pH des Mediums ermöglicht einen früheren Eintritt in die exponentielle Wachstumsphase und zeigt eine deutlich höhere Biotrockenmasse (Abb. 5.1.3 A). Bei pH 7,0 wird gegenüber pH 6,0 eine Verdopplung der BTM festgestellt.

Organische Säuren werden besonders während der exponentiellen Wachstumsphase gebildet, wenn viel Glucose aus der FTF-Reaktion zur Verfügung steht. Nach der Kultivierung weisen alle Ansätze einen pH-Wert von etwa 5,0 auf, was auf die Freisetzung organischer Säuren zurückgeführt wird.

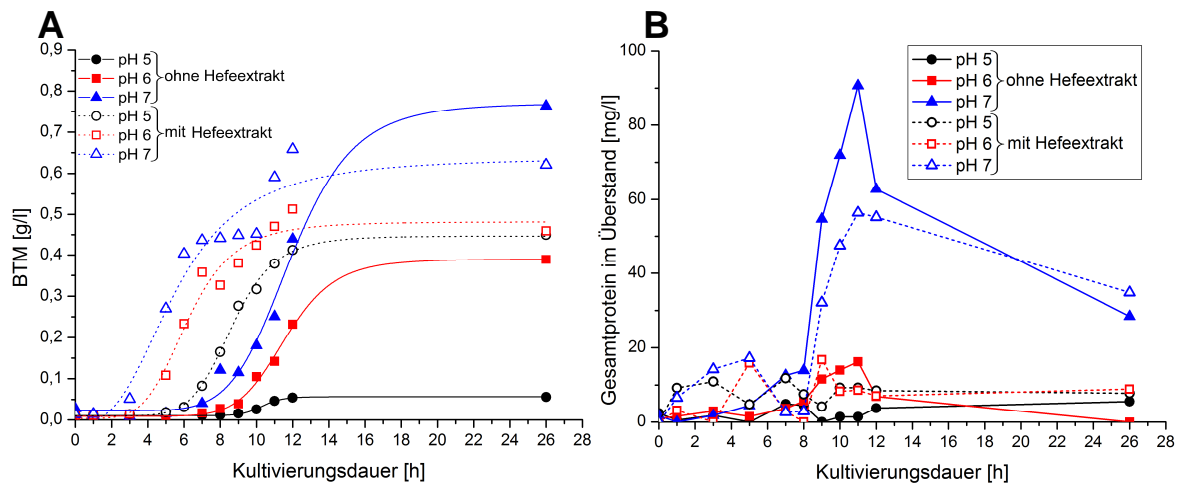


Abb. 5.1.3: Kultivierungen mit verschiedenen pH-Werten (S1 - S6). A: Biotrockenmasse; B: Proteinkonzentration des Kulturüberstandes.

Die Zugabe von Hefeextrakt führt zu einer kürzeren Adaptionsphase. Hefeextrakt mindert als schnell verwertbare C-Quelle den Nährstoffmangel bis zur Glucosefreisetzung aus der Saccharose. Zudem puffert der Hefeextrakt das Medium, da ein Wachstumsvorteil bei sauren pH-Werten zu erkennen ist. Bei Kultivierungsende weichen die Zelldichten daher nicht so stark voneinander ab als bei Versuchen ohne Hefeextrakt.

Die Zugabe des Hefeextraktes induziert eine verstärkte Sekretion proteolytischer Enzyme zum Abbau dieser komplexen Bestandteile. Dies kann sich nachteilig auf die Stabilität der FTF auswirken. Ein Abernten der Kultur kurz nach Eintritt in die stationäre Phase kann auch einen Abbau sekretierter FTF mindern. Die komplexen Nährstoffe können zudem den FTF-Expressionsdruck mindern, da die Nährstoffschließung über die FTF nur bedingt notwendig ist. Fremdprotein aus dem Hefeextrakt ist im Hinblick auf die Aufreinigung des Kulturüberstandes zu vermeiden. In der Kultur bei pH 7 ist die FTF-Aktivität bei der Zugabe von 0,1 % Hefeextrakt 12 mal niedriger als ohne den Zusatz (vgl. Kapitel 5.1.4).

Die Proteinfreisetzung bei neutralem pH ist signifikant höher als bei saurem (Abb. 5.1.3 B). Für die Enzymsekretion werden die meisten kommerziellen *Bacillus* Stämme bei pH 6,0 - 9,0 kultiviert (Burhan *et al.*, 2003). Die höchste Freisetzung erfolgt während der exponentiellen Wachstumsphase. Die Kultur ohne Hefeextrakt weist trotz deutlich geringerer Biotrockenmasse etwa 1,6-fach mehr Protein auf als die mit Hefeextrakt. Für *Bacillus subtilis* konnte Hirose *et al.* (2000) bei 2-D-Gelanalysen ein komplexes extrazelluläres Gemisch von etwa 110 Proteinen sowie zusätzlich 19 substratabhängigen Proteinen nachweisen.

5.1.1.2 Kultivierungseinfluss von Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle

Durch die Sekretion der Fructosyltransferase und die darauf folgende Enzymreaktion werden für *Bacillus subtilis* mehrere Vorteile genutzt. Zum einen wird die Freisetzung der deutlich schneller verwertbaren Glucose bewirkt. Zum anderen entsteht ein Nährstoffreservoir aus Oligo- und Polysacchariden, welches nach dem Verbrauch der Glucose als C-Quelle genutzt werden kann. Neben Glucose wird bei der Reaktion mit Saccharose auch Fructose

freigesetzt, welche nach Stülke und Hillen (2000) die Expression von extrazellulären Levanasen und fructosespezifischen Permeasen induziert. Die Expression der Exo-Levanase SacC (75 kDa) aus *B. subtilis* wird schon durch geringe Mengen Fructose maximal induziert (Martin *et al.*, 1987; 1989) und weist hochaffine hydrolytische Eigenschaften gegenüber Levan, Inulin und Saccharose auf (Kunst *et al.*, 1977; Wanker *et al.*, 1995).

Eine Verdopplung der C- und N-Substratkonzentrationen aus dem Standardansatz führt zu einer 2-fach höheren Biotrockenmasse (Abb. 5.1.4 A). Das höhere Nährstoffangebot verlängert die exponentielle Phase und die Kultur zeigt bei 26 h ein Maximum. Für die Kulturen mit Hefeextrakt zeigt sich in der stationären Phase eine deutliche Minderung der Biotrockenmasse.

Die Kulturen mit höherem Nährstoffangebot setzen 2 - 4 mal mehr Protein frei (Abb. 5.1.4 B). Diese Freisetzung ist bei 34 °C Kultivierungstemperatur deutlich geringer, so dass maximal 40 % im Vergleich zum Standardansatz bei 37 °C resultieren (Abb. 5.1.3 B, pH 7,0).

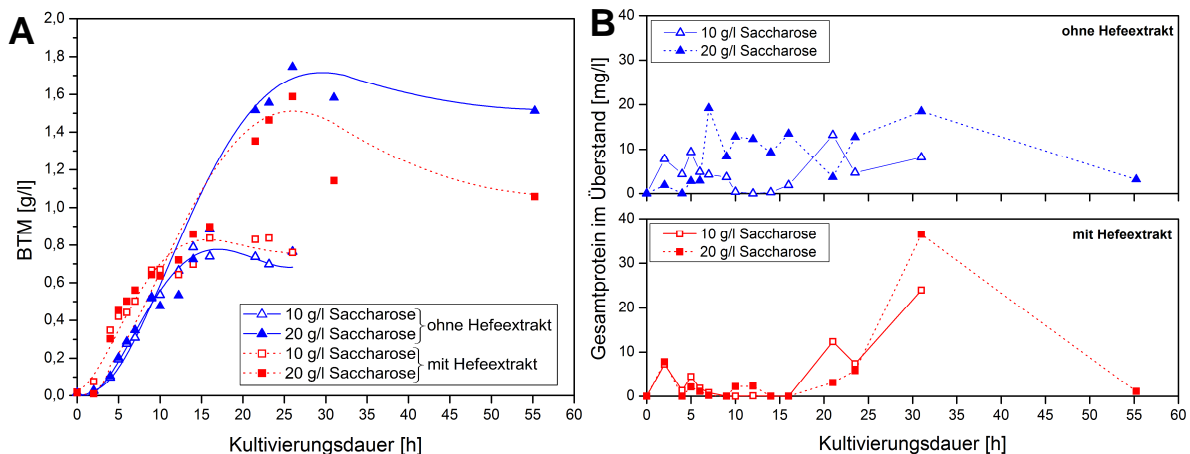


Abb. 5.1.4: Kultivierung mit 10,0 und 20,0 g/l Saccharose bzw. mit 0,5 und 1,0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S7-S9, 34 °C). A: Biotrockenmasse; B: Proteinkonzentration des Kulturüberstandes.

Um Stickstofflimitation zugunsten einer hohen Proteinexpression zu vermeiden wird das C/N-Verhältnis nach Dauner *et al.* (2001) auf einen Wert von 3,74 angepasst; zum einen auf die vollständige Nutzung der Saccharose und zum anderen auf die maximal freisetzbare Glucose. Im Vergleich zum Grundmedium ergibt sich eine 5 bzw. 10-fach höhere Konzentration an Ammoniumsulfat. Die Biotrockenmasse kann durch die höhere Saccharosekonzentration nicht weiter gesteigert werden (Anhang, Abb. 10.1.1). Saccharosekonzentrationen von 35 g/l führen zu einer deutlichen Verzögerung des exponentiellen Wachstums. Insbesondere zeigt sich dabei für die geringere Ammoniumsulfatkonzentration ein besseres Wachstum. Eine höhere Ammoniumsulfatzugabe führt zu einer leicht gesteigerten FTF-Aktivität (Kapitel 5.1.4).

5.1.2 Batchkultivierung in Kleinfermentern (Biostat Q System)

Bei den Kultivierungen im Rührkesselreaktor werden 20 g/l Saccharose analog zum Schüttelkolbenversuch in Abb. 5.1.4 eingesetzt. Über die Regulierung des pH und des Sauerstoffeintrages soll die Kultivierungszeit verkürzt und höhere FTF-Ausbeuten gewonnen werden.

Für die Bioreaktorkultivierungen (B1 - B4) ist in Abb. 5.1.5 die zeitliche Entwicklung der Biotrockenmasse, des freigesetzten Gesamtproteins, der relativen Sauerstoffsättigung und des NaOH-Verbrauchs dargestellt.

Insgesamt verkürzt sich die Kultivierung von etwa 30 h im Schüttelkolben auf ca. 11 h im Bioreaktor. Die exponentielle Wachstumsphase beginnt bei 4 - 5 h Kultivierungsdauer.

Der pH- und sauerstoffregulierte Ansatz (Abb. 5.1.5 A; B1) weist gegenüber der Schüttelkolbenkultivierung vergleichbare Werte an Biotrockenmasse und freigesetztem Protein auf.

Die Kultivierungstemperatur von 42 °C (Abb. 5.1.5 B, B2) verkürzt die Kultivierungszeit um eine Stunde. Die maximale Rührerdrehzahl wird aufgrund der geringeren Sauerstofflöslichkeit bei höheren Temperaturen 2,5 h früher erreicht. Durch den zusätzlichen Stickstoffeintrag kann die stationäre Phase verzögert werden, wobei sich die Biotrockenmasse mit 3,0 g/l verdoppelt. Dies weist auf eine Stickstofflimitation hin. Der Proteingehalt steigt mit 150 mg/l bis auf das 1,7-fache der Schüttelkolbenkultivierung an.

Ohne die Sauerstoffregulierung über die Rührerdrehzahl sinkt der pO_2 mit dem exponentiellen Wachstum schließlich bis auf 0 % bei 6,8 h (Abb. 5.1.5 C, B3). Das Wachstum erfolgt durch die mikroaerobe Versorgung verzögert und ist am ehesten mit den Schüttelkolbenversuchen zu vergleichen. Saure Stoffwechselprodukte reichern sich an.

Mit der dreifachen Ammoniumsulfatkonzentration verlängert sich die Wachstumsphase und es werden 4,6 g/l Biotrockenmasse detektiert (Abb. 5.1.5 D). Es kommt zu einer deutlichen Ansäuerung, was unter den aeroben Bedingungen auf saure Nebenprodukte (Nitrit, Nitrat) der Nitrifikation hindeutet. Die Stickstofflimitation bewirkt bei den anderen Kultivierungen eine deutlich geringere Freisetzung von Säuren. Während der Wachstumsphase wird kontinuierlich bis zu 140 mg/l Protein im Überstand angereichert.

Die N-Zugabe in der stationären Phase zeigt keine Ansäuerung durch nitrifizierende Stoffwechselwege und zeigt durch den starken Biomassezuwachs einen assimilatorischen Effekt. Akkumulierte, saure Stoffwechselprodukte wie Acetat, Citrat, Pyruvat können in dieser Phase für den Kohlenstoffmetabolismus von *Bacillus subtilis* genutzt werden (Grundy *et al.*, 1993; Gay *et al.* 1973). *Bacillus subtilis* kann nach Degering (2010) unter optimalen Kultivierungsbedingungen im Hochzelllichtverfahren bis zu optischen Dichten von ~ 100 (OD_{600}) heranwachsen. Die Stärke der FTF-Sekretion kann jedoch nur bedingt über die Biotrockenmasse gesteigert werden.

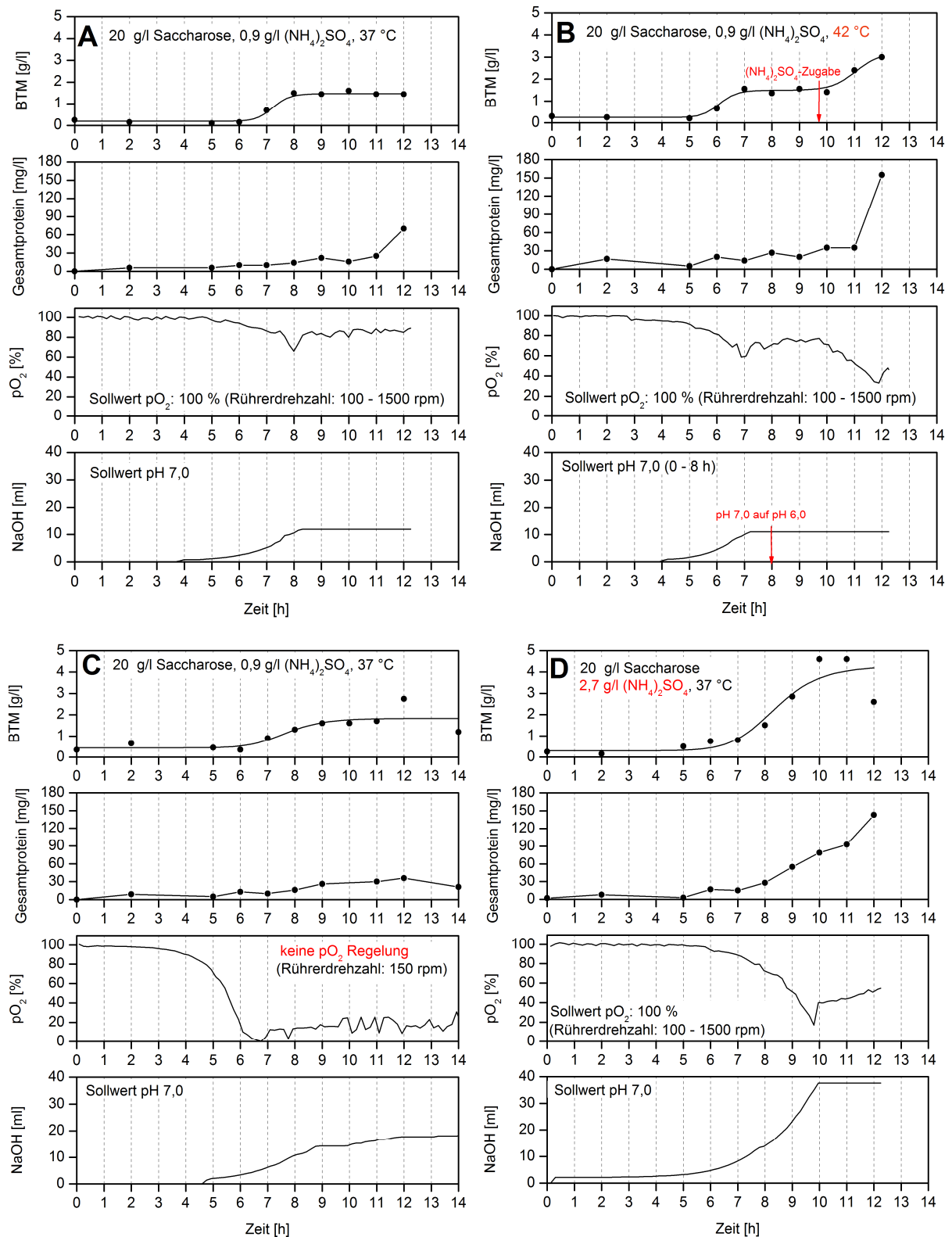


Abb. 5.1.5: Verlauf von Biotrockenmasse, Gesamtprotein im Kulturüberstand, relative Sauerstoffsättigung und Korrekturmittelverbrauch (2,5 M NaOH) für die Bioreaktorkultivierung B1 bis B4 (A - D). Variation von Rührerdrehzahl, N-Zugabe und Temperatur, mit 20 g/l Saccharose (s. Kapitel 4.8.2).

5.1.3 Kultivierungseinfluss Sauerstoffzufuhr

Eine Sauerstofflimitation initiiert Gärungsreaktionen, welche durch die freigesetzten organischen Säuren zur Wachstumsinhibierung führen. Es werden nur geringe Biotrockenmassen und FTF-Aktivitäten festgestellt. Zudem muss ein ineffizienter mikraerober Energiestoffwechsel zugunsten effizienter FTF-Sekretion vermieden werden. Bei der Schüttelkolbenkultivierung ist der Sauerstoffeintrag stark begrenzt, so dass unabhängig vom Saccharosegehalt Biotrockenmassen mit maximal 1,7 g/l resultieren.

5.1.4 Auswirkungen der Kultivierungsparameter auf die FTF-Aktivität

Nach der exponentiellen Phase kommt es zu einer erhöhten Proteinfreisetzung, was durch die gemessenen Aktivitäten insbesondere auf die Sekretion der FTF zurückzuführen ist. Der Standardansatz weist eine Aktivität von 4 mU/ml auf (S3). Die Aktivitätsmessungen (Abb. 5.1.6) zeigen, dass

- Hefeextrakt zum Saccharose-Minimalmedium zu deutlich geringeren FTF-Aktivitäten führt. (S4 - 6, S8, S10, S11)
- die Kultivierung bei neutralem pH durch die Biomassezunahme einen positiven Effekt auf die Produktion von FTF bewirkt. (S3, S6 - 15, B1 - B4)
- die Verringerung der Temperatur von 37 °C auf 34 °C bzw. die Erhöhung auf 42 °C eine Halbierung der Aktivität bewirkt. (S7 vs. S3 bzw. B2)
- eine hohe Konzentrationen an Saccharose einen inhibierenden Effekt auf die FTF Expression mit Aktivitäten (-70 %) ausübt
- durch eine deutliche Erhöhung der N- und C-Konzentration +40 % mehr FTF-Aktivität (S12, 5,56 mU/ml) erzielt werden. Die N-Zugabe bei Eintritt in die stationäre Phase bewirkt eine sprunghafte FTF-Expression mit +63 % mehr Aktivität (B2).
- eine Sauerstofflimitation zu einer verminderten FTF-Sekretion führt (s.a. S11 und B3).

Durch die Freisetzung organischer Säuren während der exponentiellen Phase führt der pH zu einer Verminderung der FTF-Aktivität. Suboptimale pH-Reaktionsbedingungen für die FTF sind wachstumsinhibierend und zeigen eine deutlich reduzierte FTF-Freisetzung.

Aktivitätssteigerungen lassen sich primär über die Biomassezunahme erreichen. Ausgeprägte Mangelzustände scheinen die FTF Expression zu verstärken. Die Versorgung mit Stickstoff ist für eine Steigerung der FTF-Expression erforderlich, wobei auch der Zeitpunkt der Zugabe wesentlichen Einfluss besitzt. Die N-Zugabe in der stationären Phase zeigt auch aufgrund der guten Sauerstoffversorgung im Bioreaktor eine erhöhte FTF-Expression. In einem Zeitraum von 2,3 h wird die FTF-Aktivität um das 6,3-fache auf 6,52 mU/ml gesteigert. Eine erhöhte N-Anfangskonzentration führt im Bioreaktor zu keiner Aktivitätssteigerung (B4).

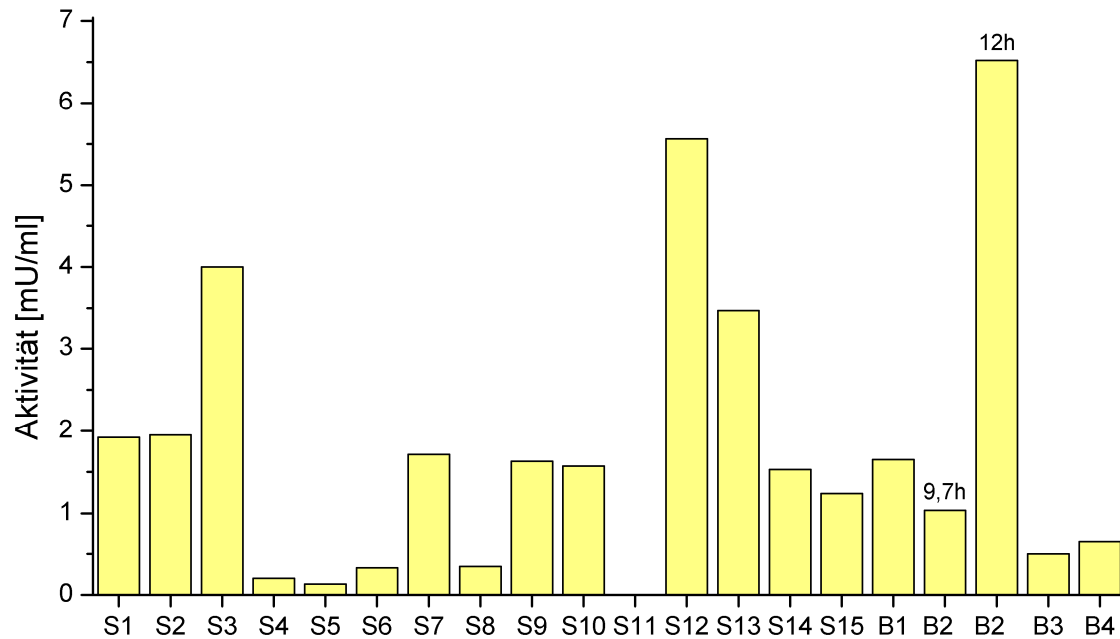


Abb. 5.1.6: Aktivität der Kulturüberstände. Ermittelt durch HPLC-Analyse für die Akzeptorreaktion Gal/Sac → Gal-Fru.

Die zur exponentiellen Phase zunehmende und danach abnehmende Viskosität im Medium lässt auf die Sekretion von Levanasen schließen. Bei dem verwendeten Bakterienstamm beobachtete Cheetham *et al.* (1989) nach der exponentiellen Phase einen Rückgang der Levankonzentration. Nach Baciú *et al.* (2005) zeigt die FTF-Aktivität erst in der späteren stationären Phase ein Maximum, was eine Überschneidung mit der Sekretion von Levanasen möglich macht. Die Anwesenheit von Levanasen kann die FOS-Ausbeute der FTF-Reaktion vermindern.

5.2 Aufreinigung und Isolierung der nativen FTF

Die Enzyme, insbesondere die FTF, liegen im Kulturüberstand in so geringen Mengen vor, dass im SDS-Gel keine Proteinbanden zu erkennen sind. Für die Isolierung und Identifikation der Transferaseaktivität ist die Aufarbeitung und Aufkonzentrierung notwendig.

5.2.1 Aufkonzentrierung nativer FTF mittels Filtration

Die Aufkonzentrierung durch Filtration zeigt sowohl für die Dead End Filtration als auch die Querstromfiltration Aktivitätsverluste bis zu 80 %. Die Verluste können durch Präzipitation oder unspezifische Wechselwirkungen zum verwendeten Material verursacht werden. Zumal die induzierte Expression mit Saccharose die Aufreinigung durch angereichertes Levan erschwert. Levan kann aufgrund seiner Affinität zur FTF mit dem Enzym assoziiert sein (Steinberg *et al.*, 2002). Die Enzym-Levan Komplexe können Fouling, Präzipitation oder Degradation hervorrufen und damit zu starken Produktivitätseinbußen führen (Roush und Lu, 2008; van Reis und Zydney, 2001). Mit dieser Methode können nur kleine Mengen Überstand (< 15 ml) aufkonzentriert werden.

Bei Aufkonzentrierung durch Querstromfiltration werden durch Konzentrationspolarisation und die einhergehende Verringerung der Partikelausschlussgröße auch kleinere Proteine akkumuliert. Dabei findet eine starke Anreicherung von Protein ~ 25 kDa ohne FTF-Aktivität statt.

Die Filtration erbringt ausreichende Mengen für eine Proteinidentifizierung (Kapitel 5.3.2).

5.2.2 Proteinaufreinigung mittels FPLC

Die aufkonzentrierten Kulturüberstände enthalten neben der FTF eine komplexe Zusammensetzung von Exoenzymen sowie aus der Zellyse freigesetzten Proteinen (vgl. Abb. 5.3.1). Es können zudem weitere Enzyme enthalten sein, die Kohlenhydratstrukturen modifizieren. Die Sekretion kohlenhydratmodifizierender Enzyme, wie der Levansucrase (50 kDa), einer Levanase (73 kDa) und einer α -Amylase (69 kDa) wird bei *Bacillus subtilis* allgemein durch Saccharose induziert (Leloup *et al.*, 1997, 1999). Insbesondere für die kinetische Charakterisierung wird die FTF daher mittels FPLC präparativ aufgereinigt.

Die FTF kann über die reversiblen Wechselwirkungen zu der **Resource Q** Matrix teilweise von anderen extrazellulären Proteinen separiert und angereichert werden (Anhang, Abb. 10.2.1). Bei der Gradientenzumischung von 0,8 - 1,4 M NaCl wird aktive FTF, verteilt auf zwei Peaks, eluiert. Im Vergleich zum Überstand wird die FTF-Aktivität um das 8,6-fache auf 28,7 mU/ml gesteigert. Die Aufreinigung wird auch für die recFTF eingesetzt (Kapitel 5.4.4).

Der Einsatz des Anionentauschers **Source 30Q** ermöglicht bei gleicher Trennleistung die Auftrennung in einem steileren NaCl-Gradienten. Daraus wird im Vergleich zur Resource Q Matrix die Aufreinigung um den Faktor 2,4 beschleunigt. Zudem wird auch der Peakverlauf deutlich eingeeengt (Anhang, Abb. 10.2.2). Die FTF-Elution erfolgt bei 0,5 - 0,7 M NaCl-Zusatz. Analog zur Resource Q-Aufreinigung wird gegenüber dem Überstand einer 8,8-fache Aktivitätssteigerung festgestellt.

Daneben ermöglicht auch der Kationentauscher **CM Sepharose** die FTF-Aufreinigung, wie sie für eine SacB aus *Bacillus megaterium* zur Isolierung und Aufkonzentrierung von Homann *et al.* (2007) verwendet wird. Die Aufreinigungserfolge sind für die FTF aus *Bacillus subtilis* nur bedingt übertragbar, da lediglich 66 % Identität auf Aminosäureebene zur SacB vorliegen. Die FTF eluiert in einem sauber differenzierten Peak bei 650 - 820 mM Phosphatpuffer (Anhang, Abb. 10.2.3). Gegenüber dem Überstand kann eine 16-fache Steigerung der Aktivität auf 44,2 mU/ml festgestellt werden. Das Protein wird unvollständig eluiert, so dass die Regeneration des Säulenmaterials deutlich mehr Zeit als bei den Anionentauschern benötigt.

Die ambivalente Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche ermöglicht die FTF-Isolierung sowohl mit anionischer als auch kationischer Ionentauscherchromatographie. Zum Entsalzen der FTF-haltigen Fraktionen zeigt die Dialyse mehr Vorteile, da diese im Vergleich zur Größenausschlusschromatographie nicht wieder verdünnt werden.

5.3 Identifizierung der FTF aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

5.3.1 N-terminale Proteinsequenzierung

Der 15,4-fach aufkonzentrierte Kulturüberstand zeigt in Abb. 5.3.1 die Zusammensetzung der extrazellulären Proteine im SDS-Gel auf.

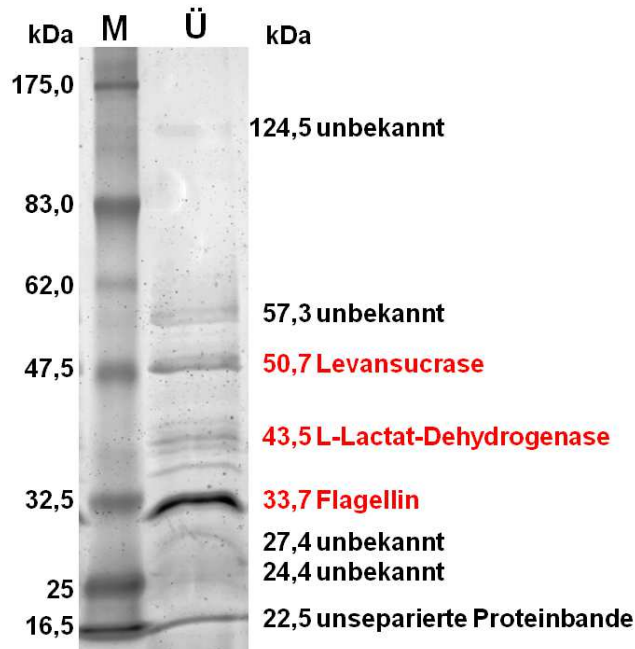


Abb. 5.3.1: 12 % SDS-Gel; M: Prestained Protein Marker; Ü: Kulturüberstand nach 26 h; rot: identifizierte Proteinbanden, schwarz: nicht identifizierbare Proteinbanden.

Die Ergebnisse der Edman-Sequenzanalyse der Proteinbanden werden in Tab. 5.3.1 zusammengefasst. Der ausgeprägte Spot des Flagellins kann bei *Bacillus subtilis* Kulturen dem polymeren Hag-Flagellin, einem 32,7 kDa großen und auch extrazellulär vorkommenden Zellbestandteil zugeordnet werden (Mukherjee *et al.*, 2013; DeLange *et al.*, 1976). Die Bande bei 43,5 kDa kann der L-Lactat-Dehydrogenase zugeordnet werden. Die AS-Sequenz KETNQKP entspricht in 100 %-iger Analogie der gereiften Levansucrase SacB aus *Bacillus subtilis*. Für das Enzym ergibt sich eine Masse von 50,0 kDa, wie sie auch in der Literatur angegeben wird (Seibel *et al.*, 2006 b; Meng und Fütterer, 2003; Steinmetz *et al.*, 1985; Vaidya und Prasad, 2012; Mäntsälä und Puntala, 1982).

Bei den kleineren Banden von 27,4 und 24,4 kDa besteht deutliche Ähnlichkeit zu den Enzymsuperfamilien der LysM- sowie der ribosomalen L21-Proteine.

Tab. 5.3.1: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung

kDa	Aminosäuresequenzposition																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	13	14	15	16	17
124,5	?	V	Q	L	T	D	(S)	Q	(S)	T	E	I	A	L	(F)	(I)	(T)	
57,3	?	Y	P	F	G	N	Y	?	G	?	L	G	Y	(G)	L			
50,7	K	E	T	N	Q	(K)	(P)	?	?									
43,5	M	N	T	H	F	N	K	V	A	L	I	?	A	?	F	V	?	?
33,7	R	I	N	H	N	I	A	A	L	N	T							
27,4	N	T	V	S	V	K	A	G	D	T	L	Y	K	I	A	S	A	N
24,4	M	Y	A	I	I	(K)	T	(G)	(G)	K	Q	I	K	V	E			

Die ermittelte Aminosäuresequenz KETNQKP dient als Vorlage zur Entwicklung der PCR-Primer für die Isolierung und späteren Klonierung der *ftf*-Gensequenz.

5.3.2 Identifizierung der Gensequenz für die Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

Die vollständig identifizierte DNA-Sequenz wird im Anhang 10.3 dokumentiert. Die DNA-Sequenz beinhaltet ein N-terminales Signalpeptid aus 29 Aminosäuren, welches nach Tjalsma *et al.* (2000) als Lipidmembrananker beim transmembranen Transport abgespalten wird.

Tab. 5.3.2: Nukleotidabweichungen zwischen der FTF aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 und *Bacillus subtilis* 168.

<i>Bacillus subtilis</i>	DNA-Basenaustausch (Nukleotidnummer ab ATG-Codon mit Signalsequenz (Anh.10.3))													
	303	480	588	616	666	888	900	909	915	921	927	1062	1083	1134
NCIMB 11871	CAT	ACG	CAG	CTG	GGC	AAG	AGT	AAG	ACT	GAA	GCT	TAT	GGG	GGC
168	CAC	ACA	CAA	TTG	GGA	AAA	AGC	AAA	ACG	GAG	GCA	TAC	GGA	GGT

Die voneinander abweichenden Nukleotidbausteine zur Gensequenz *sacB* aus *Bacillus subtilis* 168 sind in Tab. 5.3.2 dargestellt. Es können 14 DNA-Abweichungen aufgezeigt werden. Die Mutationen treten an der dritten Position des Codons auf. Eine Ausnahme bildet die Mutation an Position 616 (T→C), bei welcher die erste Position des Codons mutiert ist. Die Mutationen sind über die Sequenz verteilt und häufen sich mit 5 Mutationen besonders im Bereich 900 - 927 bp. Die Mutationen betreffen weder die Signalsequenz noch die vier hochkonservierten AS-Sequenzmotive VWD₍₈₆₎, EWSG₍₁₆₅₎, RDP₍₂₄₈₎ bzw. DEIER₍₃₄₃₎. Auf die Proteinsequenz wirken sich die Mutationen nicht aus, so dass die Sequenz auf Aminosäureebene mit der SacB aus *Bacillus subtilis* 168 identisch ist.

5.3.3 Phylogenetische Abstammung

Die DNA-Sequenz der FTF (ohne Signalpeptid) aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 wird in einem iterativen multiplen Sequenzalignment (BLAST, 2013) mit allen bisher veröffentlichten Sequenzen einer genetischen Identität von $\geq 25\%$ verglichen. Der phylogenetische Stammbaum in Abb. 5.3.2 wird auf 51 Levansucrasen aus unterschiedlichen Bakterienstämmen generiert und mittels ClustalW2 (2013) und Mega (V5.1, 2012) erstellt.

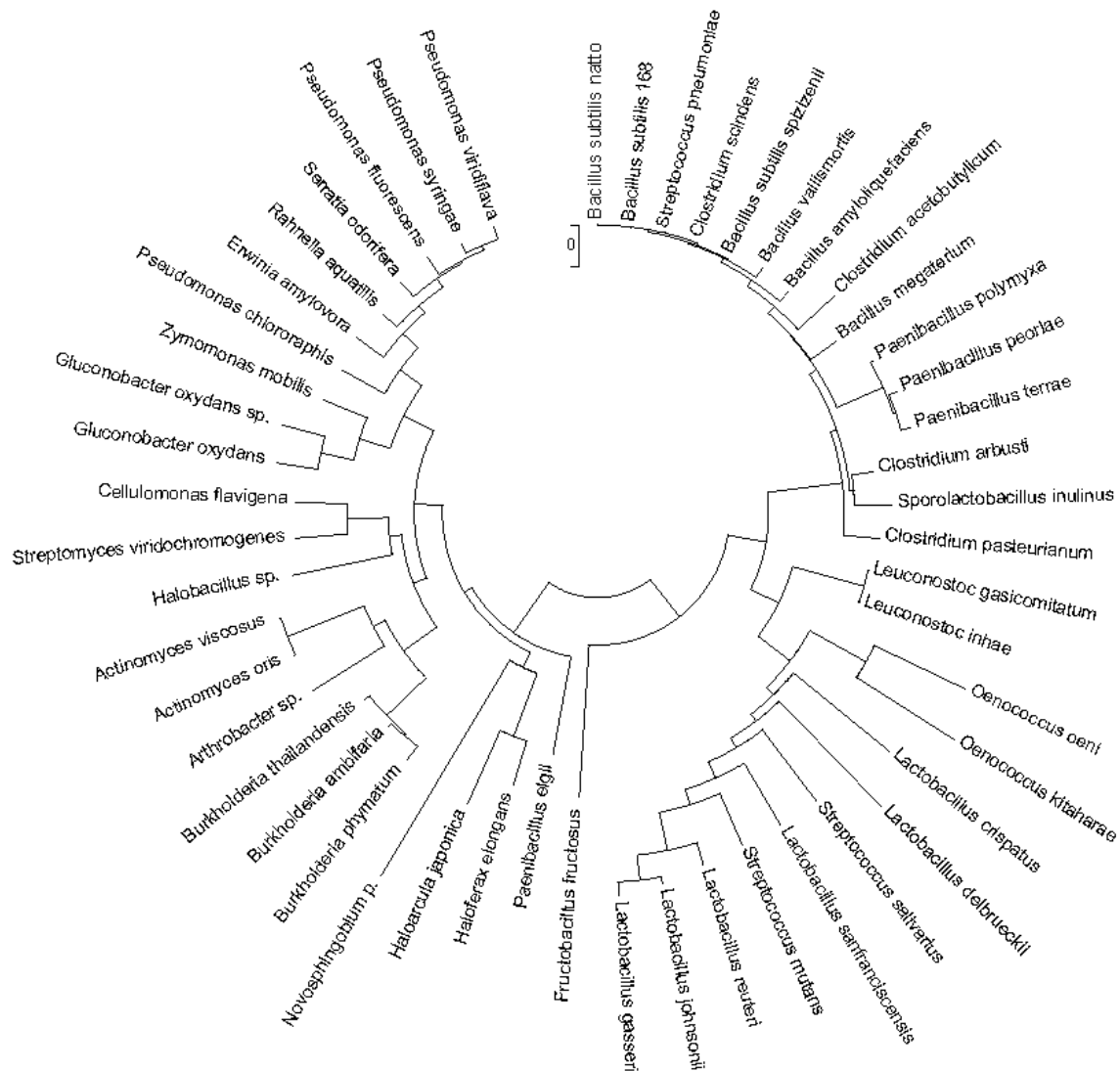


Abb. 5.3.2: phylogenetische Abstammung durch iteratives multiples Alignment der AS-Sequenz der gereiften SacB (*Bacillus subtilis* NCIMB 11871) mit 51 Levansucrasen ($\geq 25\%$ Identität).

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* 168 (Steinmetz *et al.*, 1985; Kunst *et al.* 1997) sowie das *sacN*-Gen aus *Bacillus subtilis* natto (Jang *et al.*, 2002) den höchsten Verwandtschaftsgrad zur gefundenen Sequenz aufweisen. Die nähere Verwandtschaft teilt sich bei der Abstammung auf zwei Gruppen auf. Die Gruppe mit der untersuchten FTF umfasst die Ordnung *Bacillales* und *Clostridiales* (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*). Die andere Gruppe zeigt besonders die Verwandten aus der Ordnung der Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*) wie *Streptococcus* und *Lactobacillus* auf.

Tab. 5.3.3: Sequenzanalyse auf Protein- und DNA-Ebene mit bzw. ohne Signalsequenz mittels BLAST (NCBI), FASTA (UniProt/EMBL/ SwissProt) und PDB.

Stamm	Gen	AS-Sequenz	Gen-DNA mit Signal-Sequenz	Gen-DNA ohne Signal-Sequenz	Literatur
- <i>Bacillus subtilis</i> BSn5	-	444/444 (100 %)	1422/1422 (100 %)	1335/1335 (100 %)	Deng <i>et al.</i> , 2011
- <i>Bacillus subtilis</i> 168 - <i>Bacillus subtilis subtilis</i> 6051-HGW - <i>Bacillus subtilis</i> BEST7003/7613	<i>sacB</i>	444/444 (100 %)	1408/1422 (99 %)	1321/1335 (99 %)	Steinmetz <i>et al.</i> , 1985; Kunst <i>et al.</i> , 1997
- <i>Bacillus subtilis</i> QB928	<i>sacB</i>	444/444 (100 %)	1408/1422 (99 %)	1321/1335 (99 %)	Yu <i>et al.</i> , 2012
- <i>Clostridium ramosum</i> DSM 1402	<i>sacB</i>	444/444 (100 %)	1408/1422 (99 %)	1321/1335 (99 %)	Sudarsanam <i>et al.</i> , 2007 a
- <i>Clostridium bolteae</i> ATCC BAA-613	-	444/444 (100 %)	1408/1422 (99 %)	1321/1335 (99 %)	Sudarsanam <i>et al.</i> , 2007 b
- <i>Acinetobacter baylyi</i>	<i>sacB</i>	444/444 (100 %)	1408/1422 (99 %)	1321/1335 (99 %)	Harms <i>et al.</i> , 2007
- <i>Bacillus subtilis subtilis</i> SC-8	-	443/444 (99 %) A172T	1410/1422 (99 %)	1323/1335 (99 %)	Yeo <i>et al.</i> , 2012
- <i>Bacillus subtilis natto</i> BEST195	<i>sacB</i>	443/444 (99 %) S40P	1396/1422 (98 %)	1311/1335 (98 %)	Nishito <i>et al.</i> , 2010
- <i>Bacillus subtilis subtilis</i> RO-NN-1	-	442/444 (99 %) S40P V199I	1389/1422 (98 %)	1302/1335 (98 %)	Earl <i>et al.</i> , 2012
- <i>Bacillus subtilis subtilis</i> BSP1	-	441/444 (99 %) A172T Y185H A304T	1404/1422 (99 %)	1317/1335 (99 %)	Schyns <i>et al.</i> , 2012
- <i>Bacillus subtilis natto</i>	<i>sacN</i>	440/444 (99 %) S171P Y185H A304T K444Q	1400/1422 (98 %)	1314/1335 (98 %)	Jang <i>et al.</i> , 2002

Die Identifikation wird über die Proteindatenbanken FASTA (UniProt/EMBL/ SwissProt), PDB ergänzt. Die Tab. 5.3.3 gliedert sich zunächst nach der Anzahl der Mutationen des gereiften Proteinphänotyps auf und wird durch die Mutationen auf DNA-Ebene weiter unterteilt.

Aus der Veröffentlichung des Genoms aus *Bacillus subtilis* BSn5 (Deng *et al.*, 2011) kann auch erstmals auf genetischer Ebene eine identische DNA-Sequenz zu der aus *B. subtilis* NCIMB 11871 aufgezeigt werden. Alle weiteren Levansucrasen zeigen auf genetischer Ebene eine 99 %-ige Identität auf.

Auch die FTFs anderer Bakterienstämme, wie *Clostridium ramosum* DSM 1402, *Clostridium boltae* ATCC BAA-613 und *Acinetobacter baylyi* zeigen die gleiche AS-Sequenz. Die Gensequenzen zeigen bis zu 30 stille Mutationen (*B. subtilis natto* BEST195, *B. subtilis subtilis* RO-NN-1), wobei nur ein bzw. zwei phylogenetische AS-Mutationen resultieren. Die Mutationen treten nicht in den hochkonservierten AS-Sequenzmotiven auf.

5.4 Rekombinante Fructosyltransferase-Produktion mittels *Escherichia coli*

Die Klonierung des *ftf*-Gens in ein Plasmid ermöglicht die heterologe Überexpression in *Escherichia coli*. Im Vergleich zur saccharoseinduzierten FTF-Sekretion aus *Bacillus subtilis* bietet die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* folgende Vorteile:

- eine starke Anreicherung der Fructosyltransferase ist möglich
- die Aufreinigung mittels Filtration und chromatographischer Trennung wird erleichtert, da keine Levanbildung stattfindet
- eine Degradation kann durch proteasedefiziente Stämme ausgeschlossen werden
- der Anteil von Enzymen, die Kohlenhydratstrukturen modifizieren, ist für das Enzymextrakt vernachlässigbar gering

Zur einfachen Aufreinigung der FTF werden zwei genetische Varianten mit Affinitätstag (His-Tag und Strep-Tag) generiert. Dabei wird die Expression der FTF-Varianten mit bzw. ohne Signalpeptid untersucht. Die Kultivierung, Aufreinigung und Isolierung der rekombinanten FTF wird optimiert.

5.4.1 Klonierung der *sacB* und *ftf* Gensequenz mit His-Tag

Das *ftf*-Gen wird mittels PCR aus dem Genom von *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 amplifiziert. Das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* 168 wird als Referenz eingesetzt.

5.4.1.1 Restriktionsanalyse

Die Kontrolle für die einklonierte *ftf*-Sequenz in das Plasmid pET-24+ erfolgt durch zwei Restriktionsanalysen (Abb. 5.4.1). Die eingefügten *ftf*-terminalen Schnittstellen NdeI/XhoI und die *ftf*-internen Schnittstellen EcoRI/HindIII spalten den Vektor in definierte Fragmente.

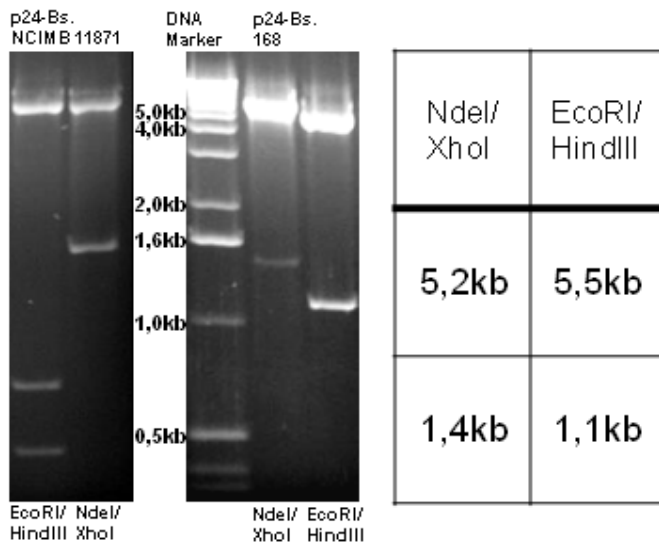


Abb. 5.4.1: Restriktionsanalyse von p24-Bs. NCIMB 11871 und p24-Bs. 168 mittels NdeI/XhoI und EcoRI/HindIII.

Die Transformationseffizienz beträgt 50 %. Bei der NdeI/XhoI Restriktion entstehen sowohl bei *sacB* aus *B. subtilis* 168 als auch bei *B. subtilis* NCIMB 11871 identische Fragmente bei 5,2 und 1,4 kb. Das Plasmid p24FTF weist bei der Restriktion mit EcoRI/HindIII ein abweichendes Bandenmuster. Die stille Mutation an der Position 888 bewirkt die HindIII-Restriktion, so dass zudem ein 687 und ein 449 Nukleotid großer Strang entsteht.

5.4.1.2 Expressionsanalyse

Bei allen Stämmen ist nach der Induktion eine Bande des rekombinanten Proteins (recSacB bzw. recFTF_{His}) bei 54 kDa (Volllängenprotein + (His)₆-Tag) zu erkennen (Abb. 5.4.2).

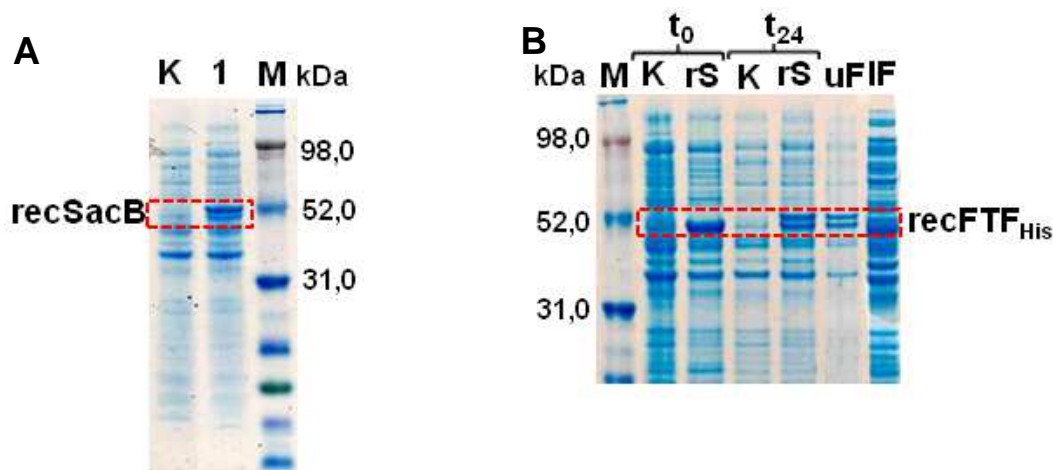


Abb. 5.4.2: Proteinexpression in *E. coli* BL21 (DE3) von der rekombinanten His-Tag-Variante SacB (A, 1, recSacB) und der FTF (B, recFTF_{His}). A: Gesamtproteinextrakt nach Induktion (8 h bei 37 °C). K = Kontrolle (pET-24 ohne *sacB*), 1 = rekombinanter Stamm (pET-24 mit *sacB*); B: Gesamtproteinextrakte zum Zeitpunkt der Induktion (t_0) und nach weiteren 24 h Inkubation (t_{24}). K = Kontrolle (pET-24 ohne *ftf*), rS = rekombinanter Stamm (induziert), uF = unlösliche Proteinfraction, IF = lösliche Proteinfraction. M = Proteingrößenmarker.

Die recSacB und recFTF_{His} zeigen aufgrund der identischen Aminosäuresequenz das gleiche Bandenmuster auf (Abb. 5.4.2 A, 1 und B, t₂₄, rS). Die SacB Expression hebt sich im Vergleich zum Kontrollstamm mit zwei stark ausgeprägten Banden bei ~ 53 und 50 kDa deutlich ab.

Bei der recFTF_{His} reichert sich durch den starken T7-Promotor bereits ohne Induktorzugabe die 50 kDa Variante an (Abb. 5.4.2 B). Durch die IPTG-induzierte Überexpression wird nach 24 h besonders die 53 kDa Variante akkumuliert.

Das Proteinextrakt wird auf die lösliche (IF) und unlösliche (uF) Proteinfraction untersucht. Die größere Variante befindet sich fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion, so dass es sich dabei wahrscheinlich um das Volllängenprotein mit His-Tag handelt.

Bei dem 50 kDa-Protein kann es sich um ein Spaltprodukt mit ~ 51 kDa handeln:

- durch eine Ähnlichkeit der *Bacillus*-Signalsequenz (29 AS ≈ 3015 Da) zu *E. coli* eigenen sec-Signalsequenzen
- durch Translationsabbruch bei Mangel entsprechend seltener t-RNAs bei der *E. coli* Proteinsynthese
- durch proteolytische Degradation einer *E. coli* spezifischen Endoprotease-Schnittstelle

Die Abspaltung der *Bacillus*-Signalsequenz durch eine Sec-abhängige Erkennung von *E. coli* kann zu einer Anreicherung der recFTF im Periplasma führen. Entsprechend der Expressionsstärke können sich inclusion bodies im periplasmatischen Raum ausbilden (Palmer und Wingfield, 2012; Arié *et al.*, 2006). Die Verminderung der Expressionsgeschwindigkeit kann den Anteil an löslichem Protein steigern, was eine Abspaltung begünstigt. Es zeigt sich daher nicht nur zum Zeitpunkt t₀ sondern auch bei Reduzierung der Kultivierungstemperatur auf 28 °C eine deutlich stärkere Ausprägung der 50 kDa Bande.

Die höchste Expressionsausbeute wird nach der Induktion durch eine Reduktion der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 28 °C für 24 h erreicht.

5.4.2 Klonierung der *ftf*-Gensequenz mit Strep-Tag

Die geringen Expressionsausbeuten, die heterogene Zusammensetzung des rekombinanten Proteins und Schwierigkeiten bei der Aufreinigung bei der recFTF_{His} machen eine alternative Expressionsstrategie notwendig.

Das *ftf*-Gen wird aus dem Vektor p24-Bs.NCIMB 11871 mittels PCR amplifiziert und ohne die Signalsequenz in den Vektor pASK-IBA63+ überführt. Die Strep-Tag Variante wird dadurch um 23 AS verkürzt, was durch den geringeren AS-Bedarf zu einer Steigerung der Ausbeute führen kann.

5.4.2.1 Restriktionsanalyse

Die Kontrolle für die einklonierte *ftf*-Sequenz in das Plasmid pASK-IBA63b+ erfolgt durch eine Restriktionsanalyse der eingefügten *ftf*-terminalen Schnittstellen NcoI/XhoI (Abb. 5.4.3).

Die Transformationseffizienz beträgt 33 % und zeigt für die Restriktion des Vektors durch NdeI/XhoI die erwarteten Fragmente bei 1,4 und 3,2 kDa. Die DNA-Sequenz wird auf ein vollständig integriertes und unmutiertes *ftf*-Gen überprüft.

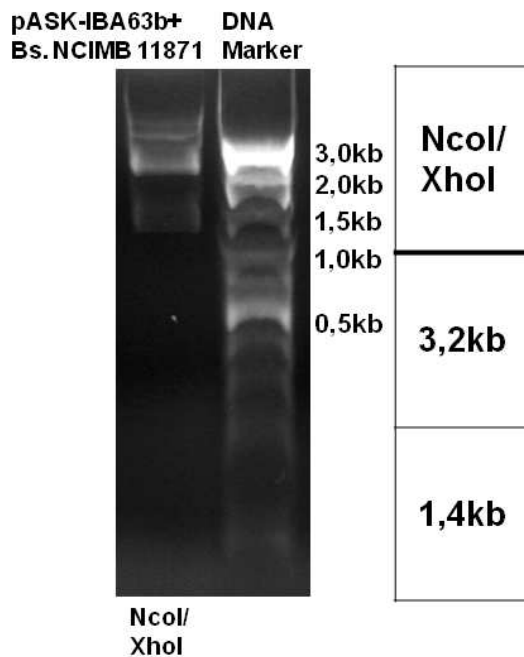


Abb. 5.4.3: Restriktionsanalyse von pASK-IBA63b+ Bs. NCIMB 11871 mittels NcoI/XhoI.

5.4.2.2 Expressionsanalyse

Die recFTF_{Strep} weist eine Proteinbande bei etwa 50 - 52 kDa auf, was der theoretischen Molekulargröße von 51,6 kDa entspricht (Abb. 5.4.4 A und B). Während bei dem Zellextrakt der Schüttelkolbenkultivierung ein kleiner Teil der recFTF_{Strep} als lösliche Fraktion vorliegt, ist bei der Kultivierung im Bioreaktor die recFTF_{Strep} in Form von inclusion bodies gebunden. Beide Kultivierungen zeigen einen hochkonzentrierten Anteil der unlöslichen recFTF_{Strep}. Gegenüber dem Überstand (IF) weist die unlösliche Fraktion deutlich weniger Verunreinigung an Wirtsprotein auf.

Im Zellpellet werden insbesondere auch Proteine mit 32 und 36 kDa stark angereichert, was auf eine Coaggregation von Wirtsprotein oder eine unvollständige Translation hindeutet. Eine Anpassung der *ftf*-Codons auf die codon usage des Wirtsorganismus kann Translationsabbrüche minimieren.

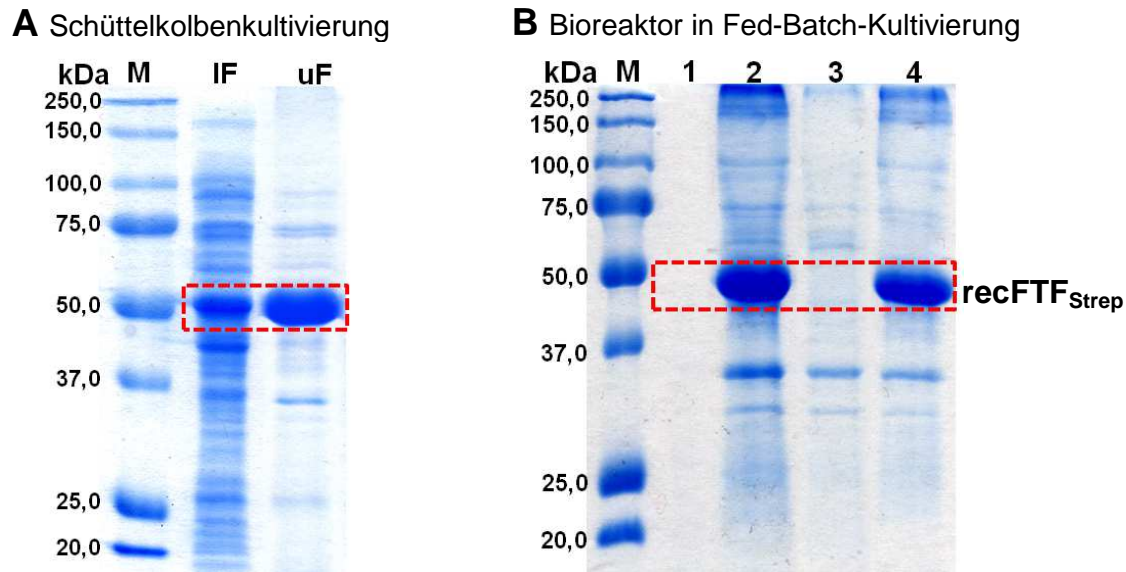


Abb. 5.4.4: Proteinexpression in *E. coli* Rosetta (DE3) von der rekombinanten FTF-Strep-Tag Variante (recFTF_{Strep}) 7 h nach Induktion. M = Proteingrößenmarker, **A**: Schüttelkolbenkultivierung: IF = lösliche Proteinfraction (1:10), uF = unlösliche Proteinfraction (1:10); **B**: Bioreaktor in Fed-Batch Kultivierung: 1 = Kulturüberstand (1:1), 2 = Zellsuspension nach Ultraschallaufschluss (1:3), 3 = Zellextrakt nach 30 min Zentrifugation (1:3), 4 = Zellpellet nach 30 min Zentrifugation (1:9).

5.4.3 Expressionsoptimierung durch Anpassung des Codon Adaptation Index (CAI)

Die spezifische Expressionsrate unterschiedlicher Gene in einem Organismus ist nach Gouy und Gaultier (1982) von der codon usage abhängig. Eine Anpassung der codon usage kann die Proteinausbeuten steigern und Probleme aufgrund von t-RNA-Limitationen mindern. Durch selten verwendete Codons kann es beim Wirtsorganismus zum Abbruch der Translation bzw. allgemein zu geringen Translationsraten und verringerter mRNA-Stabilität kommen (Sorensen *et al.*, 1989; Grote *et al.*, 2005). Speziell, die seltenen *E. coli* Codons für Arginin (AGG, AGA, CGG und CGA), Leucin (CUA), Isoleucin (AUA) und Prolin (CCC) führen oft zu Frameshift-Fehlern und schließlich zu unerwünschten Produkten (Wu *et al.*, 2004). Die Coexpression seltener t-RNAs durch den Vektor pRARE in *E. coli* Rosetta mindert Translationsprobleme für die FTF-Codons AGA (Arginin), GGA (Glycin) und CUA (Leucin). Eine nähere Betrachtung von möglichen t-RNA-Engpässen ist in der Tabelle im Anhang 10.4 dargestellt. Für alle Aminosäuren gibt es in der FTF-Gensequenz Codons, die stark von den in *E. coli* verwendeten Codons abweichen. Bei einigen Aminosäuren sind es bis zu 48 % Abweichung. Besonders in Bezug auf alle verwendeten *E. coli* Codons weichen die FTF-Codons für Glutamin, Asparagin und Lysin sehr stark ab.

Um Translationsengpässe zu erkennen und den Bedarf einer CAI-Anpassung zu ermitteln, wird zudem eine Analyse mit JCat (Java Codon Adaption Tool) nach Grote *et al.* (2005) durchgeführt. In der *ftf*-Sequenz sind 120 Codons (26 %) mit einem geringen Nutzungsgrad bei der *E. coli* Expression enthalten. Bei der Anpassung mit JCat werden 287 Basen

ausgetauscht (Anhang 10.5). Dabei wird bei der adaptierten recFTF_{Strep} pro Aminosäure lediglich die Veränderung zum jeweils am häufigsten verwendeten *E. coli* Codon durchgeführt. t-RNA-Limitationen sind durch diesen unausgewogenen Codon Austausch nicht auszuschließen. Bei dem Vergleich der FTF-Codons mit den Codons des jeweiligen Wirtsorganismus ergeben sich insbesondere für Alanin, Aspartat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin, Threonin und Valin starke Abweichungen (Anhang 10.6). Eine wesentliche Steigerung der Expressionsausbeute ist daher nicht zu erwarten.

Auch auf Translationsebene kommt es zu einem erhöhten Bedarf an bestimmten Aminosäuren. Dieser kann mit > 1,8 % gegenüber der Proteomzusammensetzung von *E. coli* bei Asparagin, Serin, Threonin, Tyrosin und besonders bei Lysin und Aspartat zu Engpässen führen.

Hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung bietet auch *B. subtilis* gegenüber *E. coli* bei der Überexpression der recFTF_{Strep} keinen wesentlichen Vorteil als Expressionsorganismus (Abb. 5.4.5).

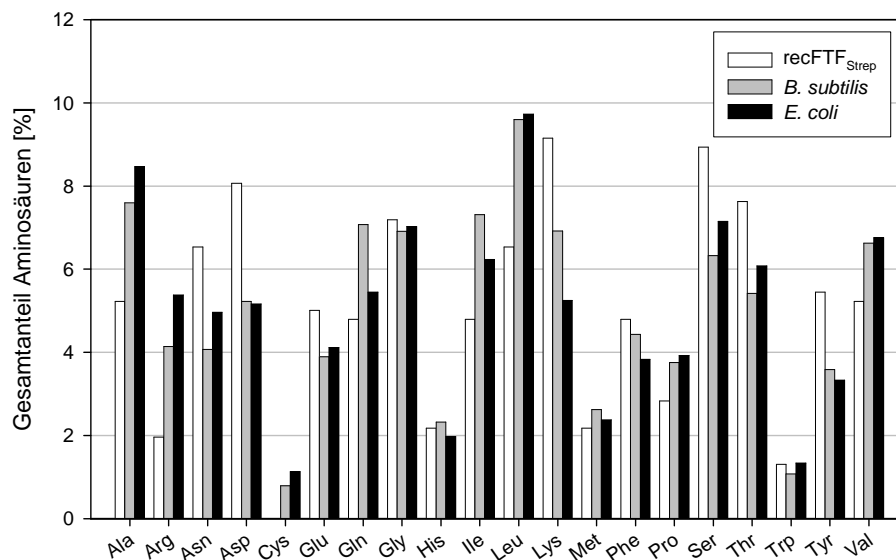


Abb. 5.4.5: Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von der recFTF_{Strep} mit den statistischen Aminosäureverteilungen codierender Sequenzen der Wirtsorganismen *E. coli* K12 und *B. subtilis* 168 (Codon usage nach Codon Usage Database; 2014).

Durch die ähnliche AS-Zusammensetzung kann es bei beiden Stämmen zu Limitation von Aspartat und Lysin bei der FTF-Synthese kommen. Gegenüber der recFTF_{His} ist die Strep-Tag Variante um 23 AS kürzer, was bei der Expression den assimilatorischen Stress mindert. Der Strep-Tag hat zudem einen geringeren Bedarf an einer einzigen t-RNA, so dass der Histidin-Bedarf vermieden und entsprechend auf mehrere AS verteilt wird.

5.4.4 Aufreinigung und Isolierung der rekombinanten Fructosyltransferase

Die FTF-Variante recFTF_{His} wird über Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie bzw. über Anionentauscherchromatographie aufgereinigt, wohingegen die recFTF_{Strep} mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie bzw. Aufarbeitung der inclusion bodies gewonnen wird.

5.4.4.1 Aufreinigung der recFTF_{His} mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung sowie Anreicherung der recFTF_{His} durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie wird nicht erzielt.

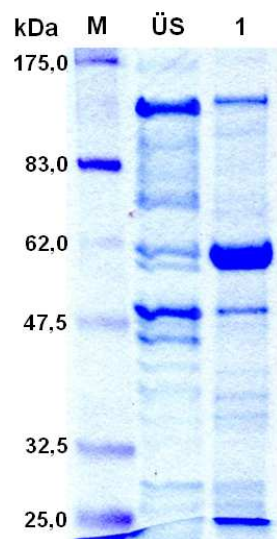
Ein Aktivitätsnachweis der erhaltenen Fraktionen zeigt, dass sich die FTF-Aktivität hauptsächlich im Durchlauf und in den Waschpufferfraktionen wiederfindet. In den Eluat-Fractionen wird die FTF-Aktivität zunehmend ausgespült.

Durch eine konformative Unzugänglichkeit des His-Tags oder den Verlust der C-terminalen Aminosäuren infolge von Abspaltung oder Translationsabbruch können die affinitätschromatographischen Wechselwirkungen nicht ausgebildet werden.

5.4.4.2 Aufreinigung der recFTF_{His} mittels Anionentauscher (Resource Q)

Die Anionentauscheraufreinigung (Resource Q) der FTF aus dem *Bacillus*-Kulturüberstand lässt sich auf die recFTF_{His} aus dem *E. coli*-Zelllysate übertragen. Damit kann die recFTF_{His} mit einem reproduzierbaren Elutionsverlauf von einem Großteil des Wirtsproteins separiert werden (Anhang, Abb. 10.7.1). Durch die hohe Fremdproteinkonzentration fällt die Trennung nach Proteinladung zu Ungunsten der FTF-Reinheit aus.

Tab. 5.4.1: Aufreinigung der recFTF_{His} mittels Resource Q.



Fraktion [Index]	Zellextrakt (ZE)	Eluat
Volumen [ml]	10	5
Gesamtprotein [mg]	126	0,7
Gesamtaktivität [U]	61	12
spezifische Aktivität [U/mg]	0,5	17,1
Aufreinigungsfaktor [-fach]	-	36,6
Ausbeute [%]	-	0,6

Abb. 5.4.6: links: FLPC-Aufreinigung und Konzentrierung mittels Amicon® Ultra (30000 MWCO); M = Marker; ÜS = Überstand; 1 = konzentrierte aktive recFTF_{His} aus FPLC Aufreinigungen (~ 1,06 mg/ml).

Die FTF wird bei einer NaCl-Konzentration von 0,36 - 0,56 M (18 - 28 % Elutionspuffer) von der Säule gespült. In den aktiven Fraktionen ist besonders Protein mit ~ 59 kDa enthalten. Die Aktivität des Eluates beträgt 1,4 U/ml und ist damit 4-fach geringer als das Zelllysats mit 6,1 U/ml.

Es werden hohe Ausbeuteverluste von > 99 % festgestellt, da ein Großteil des Proteins bei der Säulenbeladung ausgespült wird. 20 % der angegebenen Aktivität werden im Eluat wiedergefunden (Tab. 5.4.1). Bezogen auf die Proteinmenge ergibt sich ein Aufreinigungsfaktor von 36,6. Die Elution der $\text{recFTF}_{\text{His}}$ kann einem engen Bereich des NaCl-Gradienten zugeordnet werden.

Aktive und reine Fraktionen aus der Resource Q Aufreinigung werden zusammengeführt und mittels Filtration bis auf 1,36 mg/ml Gesamtprotein aufkonzentriert. In der Probe sind 1,06 $\text{mg}_{\text{recFTF}}/\text{ml}$ enthalten, was einer Reinheit von 78 % entspricht. Mit einer FTF-Aktivität von 9,2 U/ml wird diese Probe für die kinetischen Untersuchungen eingesetzt.

5.4.4.3 Aufreinigung der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der im Zellextrakt gelösten $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ mittels Strep-Tactin[®] Affinitätschromatographie wird in Abb. 5.4.7 dargestellt. Das Säulenmaterial wird mit recFTF abgesättigt und zeigt nach dem zweiten Waschschrift wenig Proteinanteile. Die Elution durch Desthiobiotin ist äußerst spezifisch und zeigt in den Eluatfraktionen besonders hohe und reine FTF-Konzentrationen. In der Hauptfraktion des Eluates werden 4 mg/ml lösliche FTF angereichert, wobei ein Teil der angereicherten bereits präzipitiert. Die gewonnene $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ weist eine Reinheit von etwa 90 % auf.

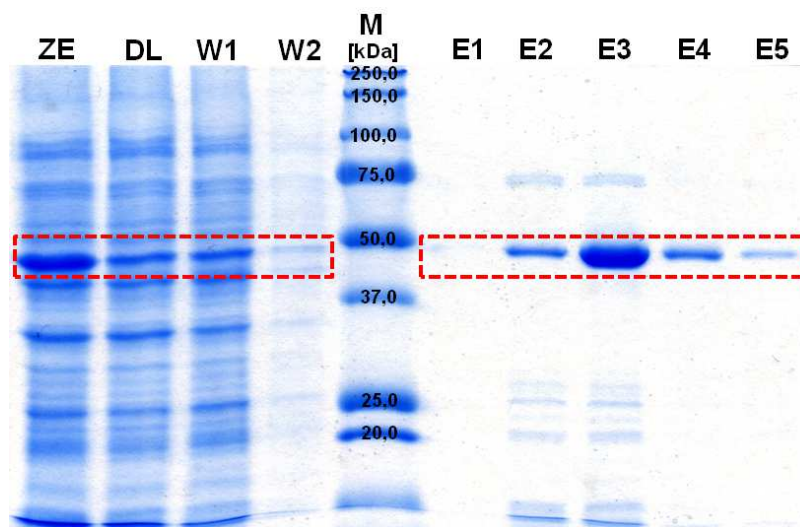


Abb. 5.4.7: Affinitätschromatographische Aufreinigung der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$. ZE = Zellextrakt; DL = Durchlauf von ZE, W1 und W2 = 1. bzw. 2. Waschfraktion; E1 - E5: Eluatfraktionen.

7,8 % des eingesetzten Gesamtproteins und 3,6 % der Gesamtaktivität werden in Form der aufgereinigten FTF in der Hauptfraktion des Eluates wiedergefunden (Tab. 5.4.2). Während der Dialyse präzipitieren etwa 80 % der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$. Besonders der pH-Wechsel von 8,0 auf

6,0 kann nahe des isoelektrischen Punktes bei 5,75 die Löslichkeit des Enzyms verringern. Zudem weist der geringe Aktivitätsverlust des Dialysates trotz der hohen Proteinpräzipitation auf eine partielle Denaturierung durch den Tris-Puffer bei pH 8,0 hin. Die Agglomerationsneigung kann allgemein durch den Puffer, die Ionenstärke und -konzentration, den pH sowie durch Zusätze wie Desthiobiotin reduziert werden.

Nach der Dialyse beträgt die Konzentration der recFTF etwa 0,3 mg/ml. Insgesamt werden 1,6 % Ausbeute bei einem Aufreinigungsfaktor von 2,5 erzielt. Die spezifische Aktivität kann von 22,2 U/mg beim Zellextrakt auf 54,7 U/mg beim Dialysat gesteigert werden.

Tab. 5.4.2: Affinitätschromatographische recFTF_{Strep}-Aufreinigung.

Fraktion [Index]	Zellextrakt (ZE)	Eluat 3 (E3)	Eluat dialysiert (E₂₋₄, dialysiert)
Volumen [ml]	7,7	2,5	7,5
Gesamtprotein [mg]	128,9	10,1	2,4
Gesamtaktivität [U]	2855,1	102,5	131,3
spezifische Aktivität [U/mg]	22,2	36,1	54,7
Aufreinigungsfaktor [-fach]	-	1,6	2,5
Ausbeute [%]	-	7,8	1,9

5.4.4.4 Aufreinigung der inclusion bodies der recFTF_{Strep}

Im Überstand des Zellextrakts ist nur wenig lösliche FTF zu finden (Abb. 5.4.8 A). Die recFTF_{Strep} reichert sich aufgrund der starken Expression besonders konzentriert in Form von inclusion bodies an. Die Fremdproteine aus dem Zellpellet können durch die Aufreinigung der inclusion bodies entfernt werden. Für das Solubilisat mit Harnstoffpuffer resultieren hohe Konzentrationen an besonders reiner recFTF. Die Gewinnung der recFTF_{Strep} aus inclusion bodies verläuft sehr effektiv und erzeugt einheitliche FTF-Chargen ohne Spaltprodukte.

Etwa 30 % der Zellpelletfeuchtmasse können als aufgereinigte inclusion bodies isoliert werden. Da die recFTF keine Disulfidbrücken bzw. Cysteine enthält, ist eine einfache Renaturierung mittels Dialyse durchführbar. Bei der Dialyse des Solubisates gegen Phosphatpuffer präzipitieren etwa 90 % des Proteins (Abb. 5.4.8 B und C). Die Ausbeute der recFTF nach Solubilisierung und Dialyse beträgt 7 % (Tab. 5.4.3). Die Ausbeute ist bei der IB-Separation von der grundlegenden Zusammensetzung, der Struktur und der Polypeptid-Konformation in den inclusion bodies abhängig (Middelberg, 2002). Die spezifische Aktivität wird von 15,2 U/mg auf 264,9 U/mg gesteigert und ist damit 5 mal höher als für die gelöste FTF mittels Strep-Tactin Aufreinigung.

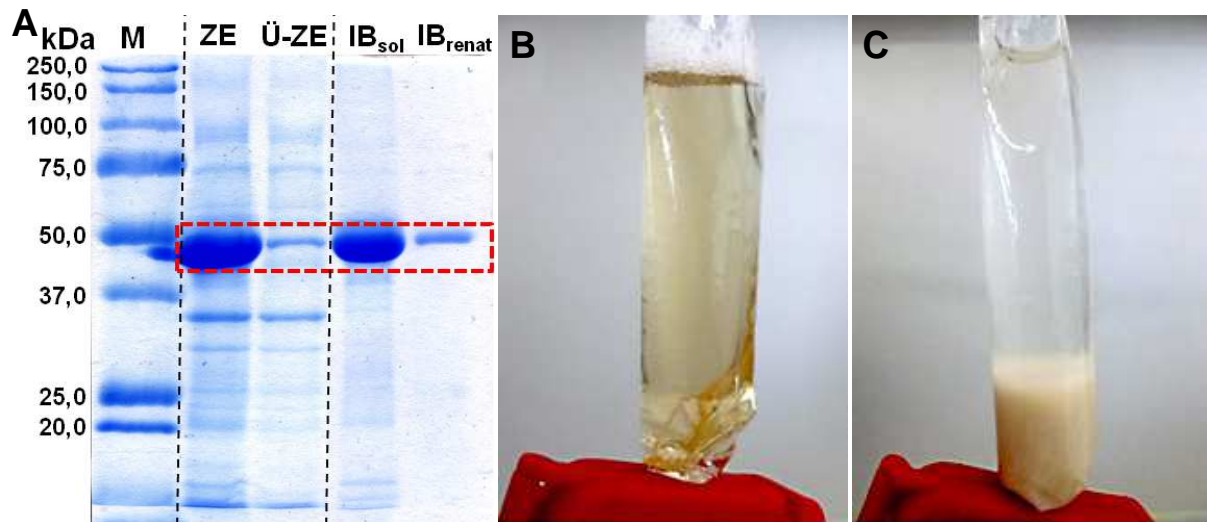


Abb. 5.4.8: Aufreinigungsprozess von recFTF_{Strep} inclusion bodies. A: SDS-Gel. M: Proteinmarker, ZE: Zellextrakt gesamt, Ü-ZE: Überstand von ZE (gelöste Proteine), IB_{sol}: aufgereinigte IB in Harnstoffpuffer solubilisiert, IB_{renat}: gelöstes Enzym nach Dialyse; B: solubilisierte inclusion bodies vor der Dialyse (IB_{sol}); C: Enzymlösung nach der Dialyse (IB_{renat}).

Durch die Resolubilisierung der während der Dialyse präzipitierten recFTF kann diese wiedergewonnen werden. Dabei werden sowohl die Konzentration gelöster FTF als auch die spezifische Aktivität der ersten Dialyse erreicht. Die Ausbeute kann durch das mehrfache Recycling des Dialysepräzipitates deutlich gesteigert werden.

Tab. 5.4.3: recFTF_{Strep}-Aufreinigung der inclusion bodies.

Fraktion [Index]	Zellextrakt (ZE)	nach Solubilisierung und Dialyse (IB _{renat})
Volumen [ml]	10,0	10,0
Gesamtprotein [mg]	77,4	5,4
Gesamtaktivität [U]	1173,7	1430,7
spezifische Aktivität [U/mg]	15,2	264,9
Aufreinigungsfaktor [-fach]	-	17,5
Ausbeute [%]	-	7,0

Die Konzentration an renaturierter recFTF lässt sich in Abhängigkeit von der eingesetzten IB-Konzentration darstellen (Abb. 5.4.9). Aus einer proteingesättigten Harnstofflösung mit 75 mg_{IB}/ml_{Harnstoffpuffer} können maximal 1,63 mg/ml gelöste recFTF gewonnen werden. Dabei resultiert jedoch ein sehr hoher Ausbeuteverlust von 98 %. Für die Resolubilisierung der IBs ergibt die Schnittfläche zwischen dem Gewinn an aktiver FTF und dem Verlust durch

Präzipitation einen optimalen Arbeitsbereich von 10 - 20 mg_{IB}/ml_{Harnstoffpuffer}. Mit FTF-Konzentrationen zwischen 0,54 und 0,78 mg_{FTF}/ml wird die Ausbeute auch dem materiellen und zeitlichen Aufwand der Proteinaufarbeitung (Dialysevolumina, Konzentrierungszeit) gerecht.

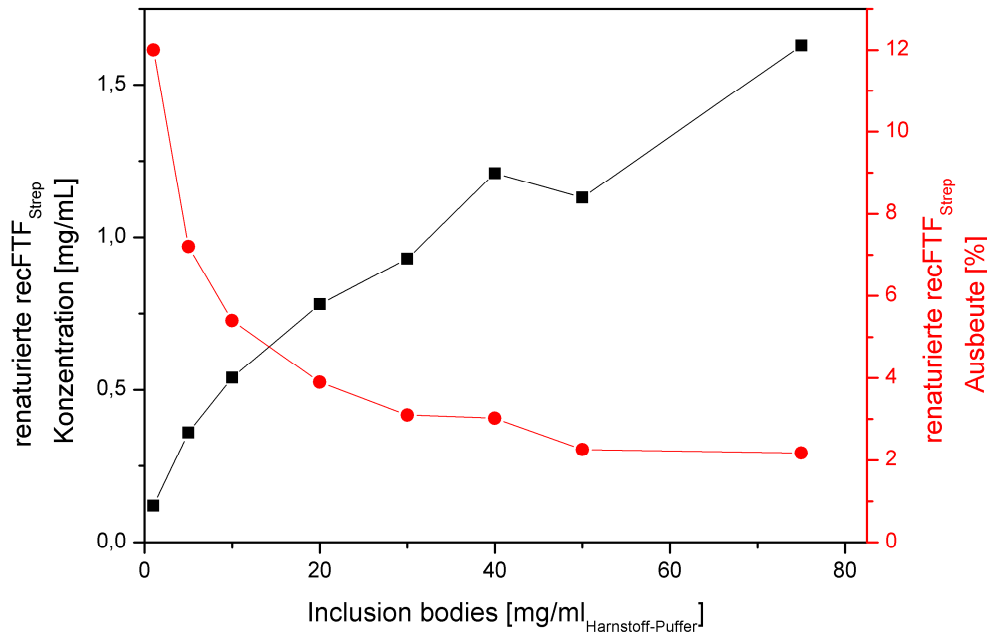


Abb. 5.4.9: Renaturierungsausbeuten von recFTF_{Strep} in Abhängigkeit von der Konzentration solubilisierter inclusion bodies.

Die renaturierte recFTF (IB_{renat}) kann durch Querstromfiltration bis auf etwa 4 mg/ml aufkonzentriert werden (Abb. 5.4.10 A). Ab einem Übergangsbereich von 2,0 - 3,0 mg_{FTF}/ml ist ein deutliches Sättigungsverhalten der Aktivität und eine sichtbare Präzipitation festzustellen. Die Rückfaltung zeigt insbesondere bei FTF-Konzentrationen $\leq 0,1$ mg_{FTF}/ml eine um 25 % erhöhte spezifische Aktivität, was auf die Neigung zur Aggregatbildung bei höheren Konzentrationen schließen lässt. Bei der Konzentrierung durch Filtration kann es besonders durch Konzentrationspolarisation und elektrostatische Wechselwirkungen verstärkt zu Agglomeratbildung kommen. Diese Effekte beeinflussen wesentlich die Aktivität der recFTF, so dass die Abnahme der spezifischen Aktivität mit dem Konzentrierungsfaktor korreliert (Tab. 5.4.4).

Trotz der hohen Reinheit der aus inclusion bodies zurückgefalteten recFTF zeigen die Chargen unterschiedlicher Kultivierungen deutliche Aktivitätsunterschiede (Abb. 5.4.10 A), wobei die spezifischen Aktivitäten bei den unterschiedlichen Kultivierungschargen zwischen 25 - 215 U/mg_{FTF} variieren.

Die großen Aktivitätsunterschiede können sich nicht aus den relativ geringen Verunreinigungen mit Wirtsprotein ergeben, sondern begründen sich vielmehr auf Wechselwirkungen und die Translationsgüte bei der Expression. Aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen konnten durch Petit-Glatron *et al.* (1980) große SacB-Proteinkomplexe aus *Bacillus subtilis* Kulturüberständen isoliert werden. Zudem entscheidet

die Güte der Resolubilisierung und Rückfaltung über die Aktivität des löslichen Proteinanteiles. Harnstoffreste sowie eine konzentrationsbedingte Aggregatbildung bzw. Fehlfaltung sind wesentliche Einflussfaktoren.

Der Anteil enthaltener Primäragglomerate bleibt bis 2,0 mg_{FTF}/ml relativ konstant, so dass sich ein spezifisches und reproduzierbares Agglomerationsverhalten für die verwendete renaturierte FTF-Ausgangslösung ergibt (Abb. 5.4.10 B).

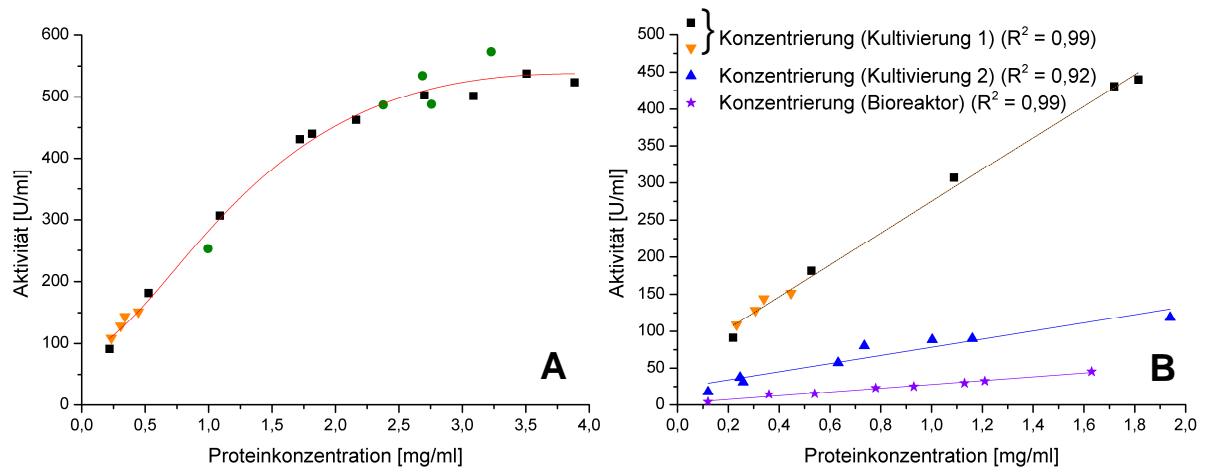


Abb. 5.4.10: Abhängigkeit zwischen IB-recFTF-Aktivität und Enzymkonzentration: A: Ultrafiltration zur Konzentrierung der renaturierten recFTF_{Strep}; B: Vergleich der Konzentrierungen renaturierter recFTF_{Strep} aus verschiedenen Kultivierungen bis zur Löslichkeitsgrenze von 2 mg_{recFTF}/ml.

Tab. 5.4.4: Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von Konzentrierung renaturierter recFTF_{Strep} aus verschiedenen Kultivierungen (vgl. Abb. 5.4.10 B).

	Kultivierung 1	Kultivierung 2	Bioreaktor
Konzentrierungsfaktor [-fach]	7,8	7,5	4,5
Spezifische Restaktivität [%]	51,8	50,9	69,9

In Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge und der spezifischen Aktivität ergibt sich für eine Konzentrierung um den Faktor 7,5 etwa ein Verlust von 50 % der spezifischen Aktivität. Für jede Verdopplung der Proteinkonzentration gehen unabhängig von der eingesetzten Charge zwischen 6,2 und 6,7 % der spezifischen Aktivität verloren.

5.4.5 Aggregation hochkonzentrierter recFTF-Lösungen

In der proteinreichen Denaturierungslösung kommt es bei der Dialyse mit Absinken der Harnstoffkonzentration zu einer Erhöhung intermolekularer Wechselwirkungen. Bei der Aufreinigung der inclusion bodies ergeben sich durch diese konzentrationsbedingte Aggregatbildung in Abhängigkeit von der Renaturierungsgüte unterschiedliche spezifische Aktivitäten (vgl. Kapitel 5.4.4.4). Die Abnahme der spezifischen Aktivität kann auf die Co-Adsorption inaktiver Proteinanteile hinweisen (vgl. Abb. 5.4.10 A):

- Die recFTF kann in multimeren Komplexen aus aktiven und inaktiven Anteilen vorliegen.
- recFTF-Komplexe aus mehreren aktiven Enzymen können eine sterisch verminderte Reaktionsfähigkeit aufweisen.

Die Zugabe des Detergens Triton X-100 mit 1 % (v/v) zur recFTF-Reaktionslösung bewirkt eine deutliche Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Für 0,5 mg_{FTF}/ml resultiert eine deutliche Aktivitätszunahme von 36 % (0,68 → 0,92 mM/min). Die Steigerung der Aktivität kann auf die Minderung von intermolekularen Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Petit-Glatron *et al.* (1980) zeigen durch Zusatz von 1 mM Triton X-100, dass intrazellulär angereicherte, inaktive SacB-Proteinkomplexe aufgelöst werden und aktive Levansucrase freigesetzt wird.

Die Wechselwirkungen der FTF zueinander können stark ausgeprägt sein, so dass auch das Wechselwirkungsgefüge durch einen gemäßigten Einsatz von Detergens stabilisiert wird. Allgemein können nach Anwar *et al.* (2012) selbst kleine Störungen im Wechselwirkungsgefüge, abseits der Substrat- bzw. Akzeptorbindestelle, direkt oder indirekt die Aktivität beeinflussen. Veränderungen der Oberflächen-Sites außerhalb des aktiven Zentrums können die Affinität des Akzeptorfructans und damit die Polymersynthese drastisch reduzieren (Strube *et al.*, 2011; Homann *et al.*, 2007; Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

Eine amorphe Aggregation resultiert nach Agostini *et al.* (2012) aus einer kritischen Proteinkonzentration, welche die Löslichkeit senkt und wesentlich von den physikochemischen Eigenschaften der Enzymstruktur abhängt. Der stabilisierende Einfluss der wässrigen Lösung wird durch hohe Proteinkonzentrationen deutlich geringer, so dass Protein-Protein Interaktionen zunehmend zu einer konformalen Destabilisierung führen können (Ohtake *et al.*, 2011). Die Proteinwechselwirkungen führen schließlich zu einer selbstinduzierten Aggregation und zur Ausbildung großer, unlöslicher Strukturen (Invernizzi *et al.*, 2012).

Intermolekulare Wechselwirkungen werden besonders durch ähnliche Struktureigenschaften wie Sequenz oder Sekundärstruktur vermittelt (Dobson, 1999). Die Zusammenlagerung zu solch multimeren Komplexen kann auch Wechselwirkungen aktiver recFTF zueinander einschließen. Bronshteyn und Steinberg (2002) konnten bei der Immobilisierung einer nativen FTF aus *Streptococcus mutans* eine Bildung von solchen katalytisch aktiven FTF-

Clustern beobachten. Aus *Bacillus subtilis* QB 2010 können nach Petit-Glatron *et al.* (1980) SacB-Proteinkomplexe mit etwa 300 kDa isoliert werden.

Die Betrachtung der Proteinstruktur der SacB aus *B. subtilis* offeriert in der 3-dimensionalen Darstellung nach Meng und Fütterer (2003, RSCB Protein Data Bank, PDB-Code: 1PT2; vgl. Abb. 2.4.6) mehrere β -Faltblattstrukturen auf der Außenseite des Enzyms. Diese befinden sich auf der vom aktiven Zentrum abgewandten Seite und können die Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen begünstigen. Die Bildung von aktiven Proteinkomplexen wird durch die Wechselwirkungen von β -Faltblattstrukturen vermittelt (Wu *et al.*, 2011; Garcia-Fruitos *et al.*, 2005). Auch die zur FTF strukturgleichen monomeren Einheiten der β -Xylosidasen (*Bacillus* sp.) werden über die enthaltenen β -Faltblätter zu funktionellen Quartärstrukturen bzw. aktiven Komplexen koordiniert (Patskovsky *et al.*, 2005; Brück *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011). Die verwendete FTF beinhaltet mit 36 % einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen (vgl. Abb. 2.4.5). Gerade bei der Agglomeration von β -Faltblattproteinen kann es zu Strukturen kommen, die einen beträchtlichen Anteil der nativen Proteinstruktur beinhalten (Bratko und Blanch, 2003). Hashimoto *et al.* (2010) postuliert für die intermolekularen Wechselwirkungen von Glycosyltransferasen, dass auch asymmetrisch geformte Loops, terminale Stränge sowie α -Helices die Zusammenlagerung vermitteln können.

In den vernetzten Strukturen des Proteinniederschlags kann es zu einer Akkumulation von polymeren Produkten durch Wechselwirkung mit dem Protein kommen (vgl. Kapitel 5.5.7). Die Detergenswirkung kann dabei ebenso die Zugänglichkeit zum aktiven Zentrum verbessern.

Eine Aussage über den Anteil von korrekt gefalteter, partiell gefalteter aber schon katalytisch aktiver sowie missgefalteter FTF in den Aggregaten kann nicht gemacht werden.

5.4.6 Expressionsoptimierung durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen

5.4.6.1 Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Expression löslicher und unlöslicher recFTF_{Strep}

Eine Anpassung der Kultivierungsparameter kann nach Gautam *et al.* (2012) die Ausbeute an aktivem Protein signifikant erhöhen. Zur Ausbeuteoptimierung wird die Bildung von gelöster sowie der in inclusion bodies gebundenen recFTF über die Kultivierungsdauer näher betrachtet. Indem zum Zeitpunkt der Induktion die Kultivierungstemperatur auf 28 °C abgesenkt wird, soll die Löslichkeit der recFTF verbessert werden.

Durch die Anreicherung der recFTF_{Strep} IBs werden im Vergleich zum Negativstamm infolge des höheren Brechungsindex bis zu 1,3-fach höhere OD-Werte gemessen. Bei der Kultivierungstemperatur von 37 °C entstehen deutlich mehr inclusion bodies als bei 28°C, was durch die höhere OD trotz geringerer BTM aufgezeigt wird (Abb. 5.4.11). 7 h nach der Induktion weisen beide Kulturen ein OD- bzw. BTM-Maximum auf.

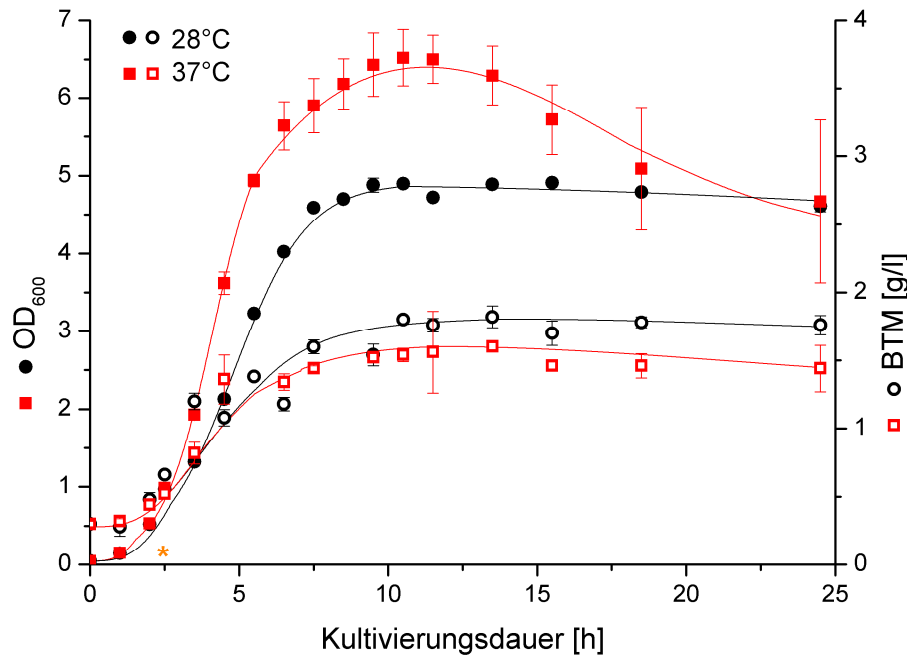


Abb. 5.4.11: Zeitliche Entwicklung der OD_{600} und BTM für *E. coli* Rosetta recFTF_{Strep} bei der Schüttelkolbenkultivierung mit 28 °C und 37 °C nach der Induktion (*).

Eine Erhöhung des Anteils an löslicher recFTF_{Strep} kann durch eine verlangsamte Proteinsyntheserate bei 28 °C Kultivierungstemperatur erreicht werden (Abb. 5.4.12 A). Für geringere Kultivierungstemperaturen wird auch nach Schein und Noteborn (1988) die Bildung von löslichem Enzym zugunsten einer verminderten Aggregatbildung des rekombinanten Proteins aufgezeigt. Der lösliche Proteinanteil an recFTF wird durch die Temperaturabsenkung um 27 % gesteigert. Gegenüber der 37 °C Kultivierung wird die spezifische Aktivität von 1,9 auf 3,0 U/mg gesteigert. Durch eine langsamere Bildungsgeschwindigkeit kann ein höherer Anteil aktiver recFTF gewonnen werden.

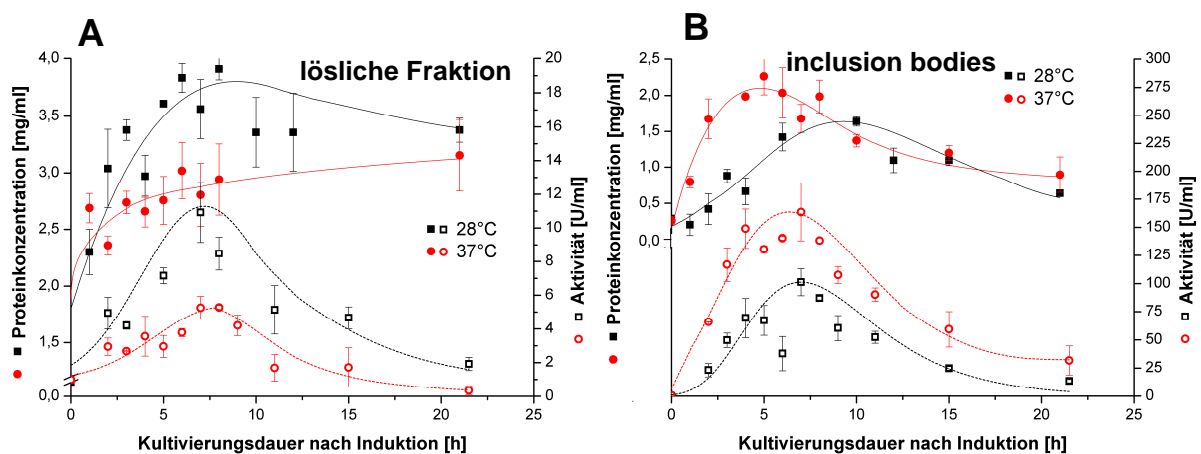


Abb. 5.4.12: Proteinkonzentration und FTF-Aktivität nach der Induktion bei 28 °C und 37 °C. A: Zelllysätüberstand; B: inclusion bodies.

Bei 37 °C werden infolge der höheren Stoffwechselrate verstärkt inclusion bodies gebildet (Abb. 5.4.12 B). Die Aktivität ist bei 37 °C (163,6 U/ml) um 60 % höher als bei 28 °C (101,2 U/ml). Mit Beginn der stationären Phase zeigt sich ein deutlicher Abbau der inclusion bodies, was auch an der OD-Abnahme deutlich wird.

Der Effekt, dass bei einer niedrigen Kultivierungstemperatur der Anteil von korrekt gefalteten Proteinen in den IBs steigt (Menart *et al.*, 2010), wird anhand der spezifischen Aktivitäten für die recFTF-IBs nicht nachgewiesen. Für 37 °C können reine Fraktionen mit einer 32-fach höheren spezifischen Aktivität von 97,3 U/mg gewonnen werden. Für 28 °C werden am Maximum nur etwa 67,5 U/mg festgestellt.

Für die rekombinante recFTF_{Strep}-Produktion bei 28 °C und 37 °C wird sowohl für die lösliche als auch die IB-Fraktion ein optimaler Erntezeitpunkt von 6 - 7 h nach der Induktion aufgezeigt. Dies entspricht zeitlich exakt dem Eintritt von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Für diesen Zeitpunkt werden im Batchbetrieb die höchsten FTF-Ausbeuten erzielt. Das lösliche Protein weist einen hohen Wirtsproteinanteil auf, was die spezifische Aktivität gegenüber dem unlöslichen Protein stark mindert. Insgesamt ist die spezifische Aktivität der IB-Fraktionen mit bis zu 260 U/mg etwa 100-fach größer als die der Zelllysatüberstände. Die leichtere Aufarbeitung der IBs ermöglicht zudem hohe Ausbeuten der recFTF_{Strep}.

5.4.6.2 Untersuchungen zur Proteinexpression der recFTF_{Strep} bei Bioreaktorkultivierung

Bei der Bioreaktorkultivierung kann im Batchbetrieb durch die hohe Sauerstoffversorgung und die Kontrolle der Kultivierungsparameter eine Verbesserung der recFTF Ausbeute erreicht werden.

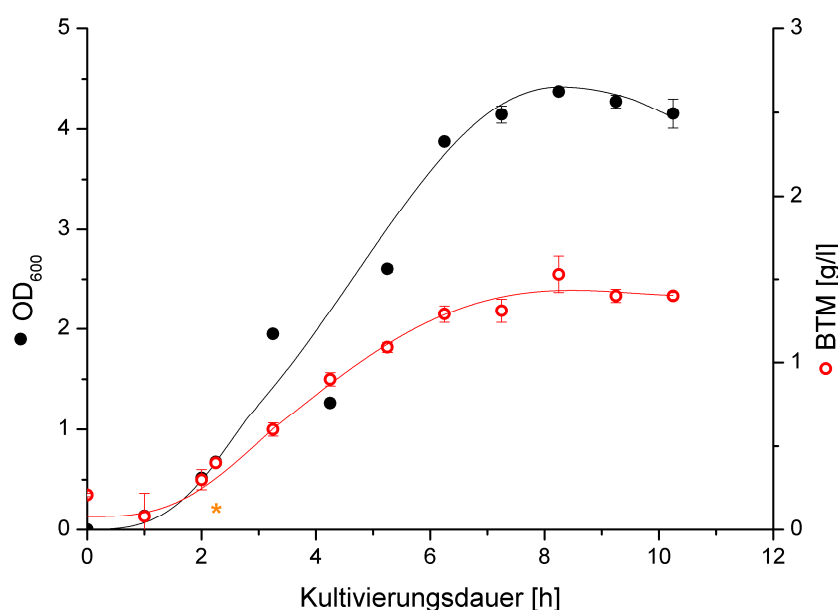


Abb. 5.4.13: Zeitliche Entwicklung der OD₆₀₀ und BTM für *E. coli* Rosetta recFTF_{Strep} bei der Bioreaktorkultivierung und Zeitpunkt der Induktion (*).

Es werden für den Überstand und die IBs maximale Proteinkonzentration von 9,5 mg/ml bzw. 1,5 mg/ml detektiert (Abb. 5.4.14 A und B). Der Eintritt in die stationäre Phase stellt auch bei der Bioreaktorkultivierung den optimalen Erntezeitpunkt dar. Dabei werden mit 3,9 bzw. 148,2 U/ml die höchsten Aktivitäten für Überstand und IBs gemessen. Die gemessenen Aktivitäten sind vergleichbar mit denen der Schüttelkolbenkultivierung. Im Gegensatz dazu ist im Bioreaktor bereits zum Zeitpunkt der Induktion eine Aktivität von 3,9 U/ml im Überstand und von 18,4 U/ml bei den IBs messbar.

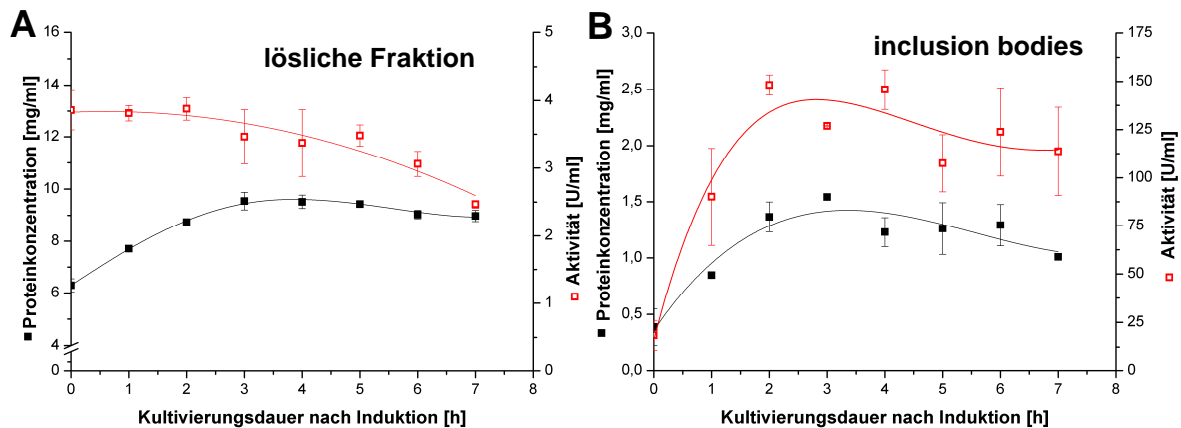


Abb. 5.4.14: Proteinkonzentration und FTF-Aktivität nach der Induktion bei Bioreaktorkultivierung.
 A: Zellysatüberstand; B: inclusion bodies.

Bei der Bioreaktorkultivierung wird ein starker Anstieg des pH-Wertes bis pH 7,7 detektiert. Ohne pH-Regulierung wird ein pH > 8 erreicht. Die im Allgemeinen beim exponentiellen Wachstum freigesetzten organischen Säuren haben deutlich weniger Einfluss auf den pH als die induzierten alkalischen Nebenprodukte. Die Kopplung mit der recFTF_{Strep}-Expression lässt darauf schließen, dass das LB-Medium für den zusätzlich durch die Proteinsynthese belasteten Stoffwechsel nicht ausreichend Nährstoffe bereitstellen kann. Aus der Nährstofflimitierung resultiert eine Stoffwechseländerung, so dass *E. coli* zunehmend alkalisch wirkende Ammoniumionen in das Medium freisetzt (Suzuki *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2004). Auch die Freisetzung von alkalischen Stoffwechselprodukten aus der Proteinsynthese oder von m-RNA kann eine leicht alkalische Wirkung im Medium hervorrufen.

Der pH-Anstieg zeigt zudem keinen offensichtlichen Einfluss auf die Proteinexpression und das Zellwachstum. *E. coli* Kultivierungen können nach Small *et al.* (1994) selbst bei pH-Werten bis 9,8 in LB Medium ohne Limitation weiterwachsen. Ein Einfluss des pH-Wertes im Medium auf die Aggregation bzw. IB-Bildung ist aufgrund des stabilen cytoplasmatischen pH-Bereiches von 7,5 - 8,0 nach Booth (1985) für das neutrophile Bakterium *E. coli* auszuschließen.

Eine höhere Produktivität lässt sich mit dem großen apparativen Aufwand des Bioreaktors über eine Biomasseanreicherung im Fed-Batch Verfahren und eine späte Induktion erzielen.

Martinez-Martinez *et al.* (2007) zeigen bei der Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* Rosetta Zelldichten bis zu 66 g/l, wobei sich der Stamm besonders aufgrund der geringen Acetat-Freisetzung und der Plasmidstabilität für diese Kultivierungsstrategie eignet.

Im Fed-Batch Versuch kann durch die kontinuierliche Zugabe von Glucose der pH auch nach der Induktion gesenkt werden. Dabei resultiert bei gleicher Kultivierungsdauer im Vergleich zur Batchkultivierung eine 4,5-fach höhere Zelldichte (6,8 g/l BTM).

5.4.6.3 *Escherichia coli* Zellaufschluss mit Zusatz von DNase / Lysozym

Die Maximierung der Ausbeute an recFTF hängt von der Effizienz der Aufschlussmethode ab. Dabei muss bei möglichst hohem Aufschlussgrad eine effektive Aufarbeitung gewährleistet sein. Sowohl das Puffersystem als auch die Zugabe von Lysozym und DNase beeinflussen das Aufschlussverhalten und Handling der Proben. Die Proteinkonzentrationen korrelieren mit den gemessenen Aktivitäten der Proben.

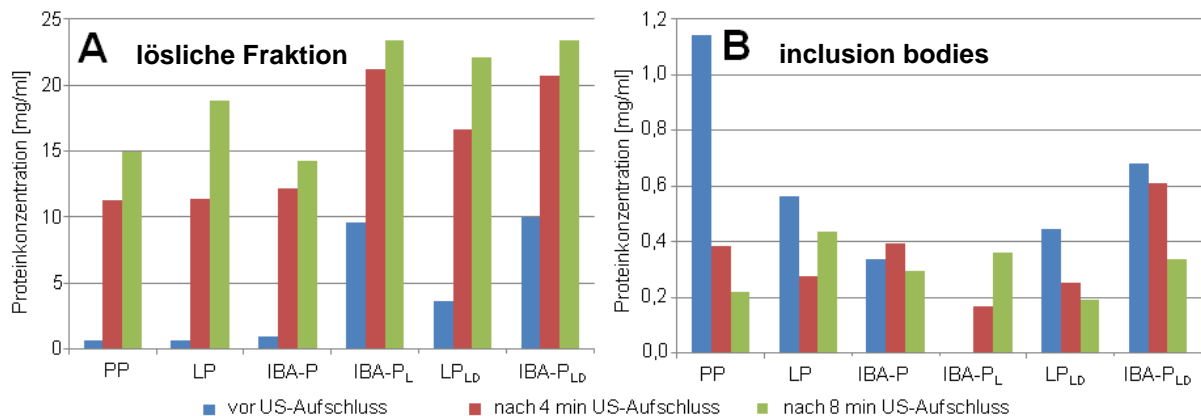


Abb. 5.4.15: Unterschiedliche Puffersysteme für den Ultraschallaufschluss. A: Proteinüberstände; B: inclusion bodies; PP: 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0); LP: 50 mM TRIS-Lysepuffer (pH 8,0); IBA-P: IBALyse Puffer (pH 8,0); Index: Zusatz von Lysozym (L) und/oder DNase (D).

Ohne Zusätze werden etwa 70 % Protein beim ersten und weitere 30 % beim zweiten Ultraschallaufschluss freigesetzt (Abb. 5.4.15 A). Die Abtrennung der FTF aus dem Zellextrakt wird durch eine zunehmende Beanspruchung infolge kleinerer Zellbruchstücke deutlich erschwert. Der Lysozymzusatz bewirkt bereits vor der Beanspruchung die Freisetzung von etwa 15 mal mehr Protein. Die zusätzliche Behandlung mit Ultraschall ergibt 50 % mehr gelöstes Enzym, wodurch etwa 700 U/ml an löslicher recFTF erzielt werden. Je nach Aufschlussgrad werden nach dem ersten Ultraschallaufschluss spezifische Aktivitäten zwischen 30 und 35 U/mg im Zellextrakt detektiert. Die spezifischen Aktivitäten liegen nach dem zweiten Ultraschallaufschluss mit 33 bis 40 U/mg etwas höher.

Die IB-Proben ohne Ultraschallaufschluss setzen allein durch die Wirkung des Detergens- und Denaturierungspuffers deutlich Protein frei (Abb. 5.4.15 B). Auch wenn die Proteinkonzentration der inclusion bodies deutlich geringer ausfällt, ist die Ausbeute und Reinheit deutlich größer als bei der gelösten recFTF des Zellextraktes.

Die FTF wird mit zunehmendem Energieeintrag aus den IBs gelöst, was tendenziell die Ausbeute mindert. Das Herauslösen der IB-recFTF durch Ultraschall bewirkt dadurch eine deutliche Erhöhung der spezifischen Aktivität im Zellextrakt.

Lysozym bzw. DNase-Zusatz ist für eine technische Umsetzung sehr kostenintensiv und eignet sich nur für die Gewinnung von löslicher FTF im Labormaßstab. Durch Behandlung mit Lysozym verhindert die gummiartige Konsistenz des Pellets die Aufarbeitung der IBs.

5.5 Untersuchungen zur Kinetik und zur Akzeptorspezifität der FTF aus *Bacillus subtilis* 11871 und den rekombinanten Varianten recFTF_{His} und recFTF_{Strep}

5.5.1 Einfluss der Temperatur und des pH auf die Aktivität der recFTF_{His}

Die katalytische Effektivität von Enzymreaktionen ist stark abhängig von der Temperatur und dem pH, welche auf die Produktausbeute und Enzymstabilität der recFTF optimiert werden.

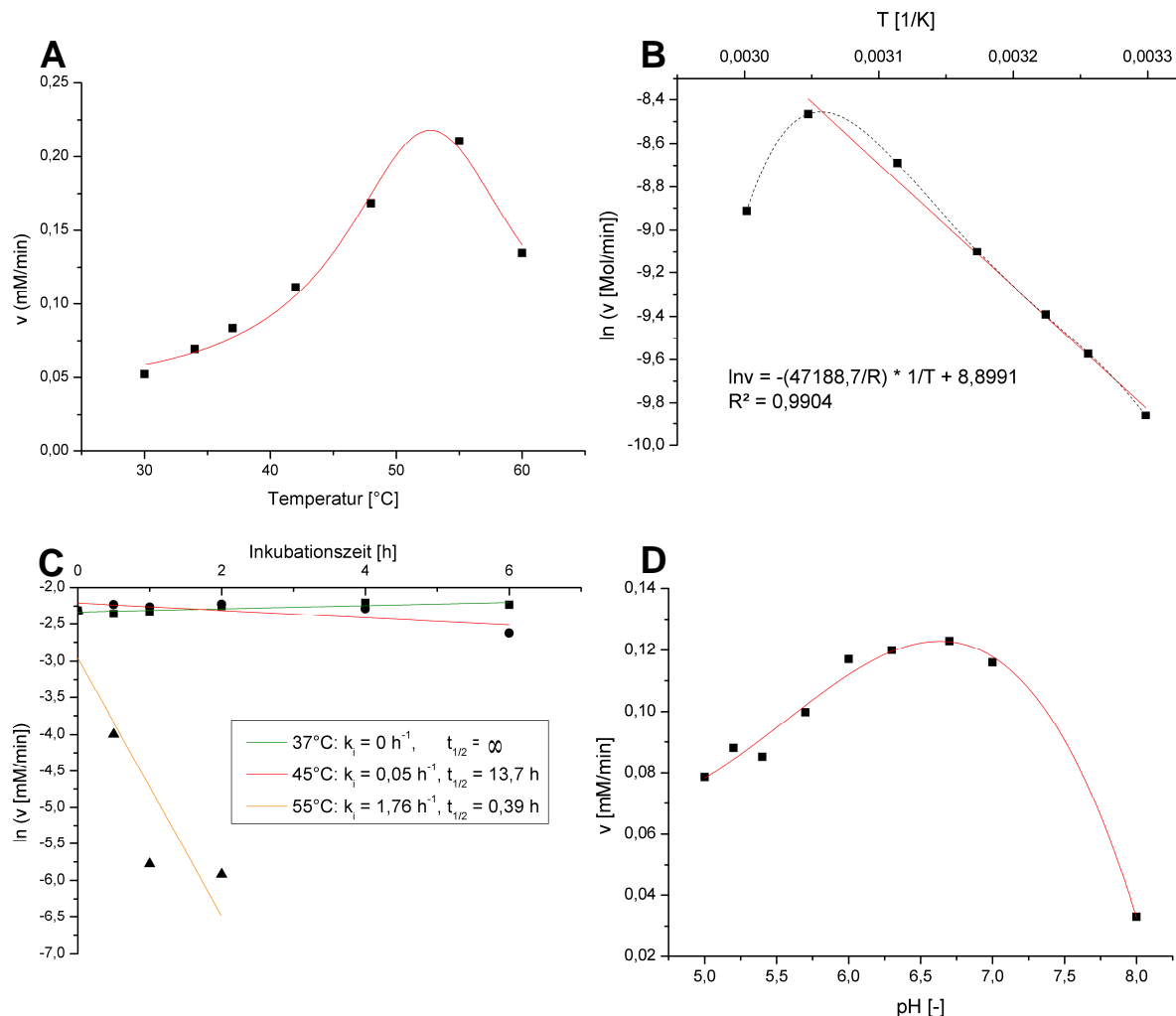


Abb. 5.5.1: Einfluss der Temperatur und des pH auf die katalytische Aktivität der recFTF_{His}:
A: Temperaturabhängigkeit; B: Darstellung nach Arrhenius; C: Temperaturstabilität, Inaktivierungsraten und Halbwertszeiten; D: pH-Abhängigkeit.

Literaturbezogene Daten für T_{opt} zeigen für FTFs aus *Bacillus*-Stämmen ein breites Spektrum von 25 bis 50 °C (vgl. Tab. 2.5.1). Damit weist die recFTF mit 53 °C ein hohes Temperaturoptimum auf (Abb. 5.5.1, A), welches nach Baciú (2005) mit der maximalen Aktivität bei 50 °C für den wt-Überstand korreliert. Die Aktivierungsenergie von 47,2 kJ/mol liegt im erwarteten Bereich (Abb. 5.5.1, B), da die Aktivierungsenergien enzymatischer Reaktionen im Allgemeinen zwischen 20 - 80 kJ/mol liegen (Lasch, 1987; Christen und Jaussi, 2005).

Bei einer Temperatur von 55 °C nahe T_{opt} ergibt sich eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 23,4 min und bei 45 °C von 13,7 h (Abb. 5.5.1, C). Für den Arbeitsbereich ab ≤ 37 °C wird bis zu einer Inkubation von 6 h keine Aktivitätsabnahme festgestellt. Die recFTF_{His} ist im Vergleich zu anderen FTFs aus *Bacillus subtilis* (52 min für 40 °C bei Ortiz-Soto *et al.*, 2008; 4 min für 50 °C bei Mäntsälä und Puntala, 1982) etwas temperaturstabiler. Es gibt keinen signifikanten Einfluss der Temperatur auf das Transfructosylierungs-/Hydrolyseverhältnis (Inthanavong, 2011), welches nach Chambert und Treboul (1976) im Wesentlichen aus der Akzeptorspezifität resultiert.

Das breite pH-Optimum der recFTF_{His} entspricht den bereits nachgewiesenen pH-Optima für FTFs aus *Bacillus subtilis* (Abb. 5.5.1, D), welche im Bereich von pH 5,6 - 6,0 liegen (Ortiz-Soto *et al.*, 2008; Vaidya und Prasad, 2012). Für pH-Werte $> 7,0$ wird eine starke Aktivitätsabnahme festgestellt, so dass für pH 8 nur noch 27 % der Maximalaktivität gemessen werden.

Das Enzym zeigt zudem eine hohe Lagerfähigkeit sowie hohe Belastbarkeit gegenüber physikalischen Einwirkungen. Für die längere Lagerung bei -20 °C, mehrfachen Einfrier- und Auftauzyklen, längerer Ultraschallbeanspruchung und Scherbelastung werden keine signifikanten Aktivitätsverluste festgestellt.

5.5.2 recFTF-Reaktion mit Saccharose

Die recFTF_{His} zeigt für die Saccharosereaktion deutlich hydrolytische Aktivität (Abb. 5.5.2).

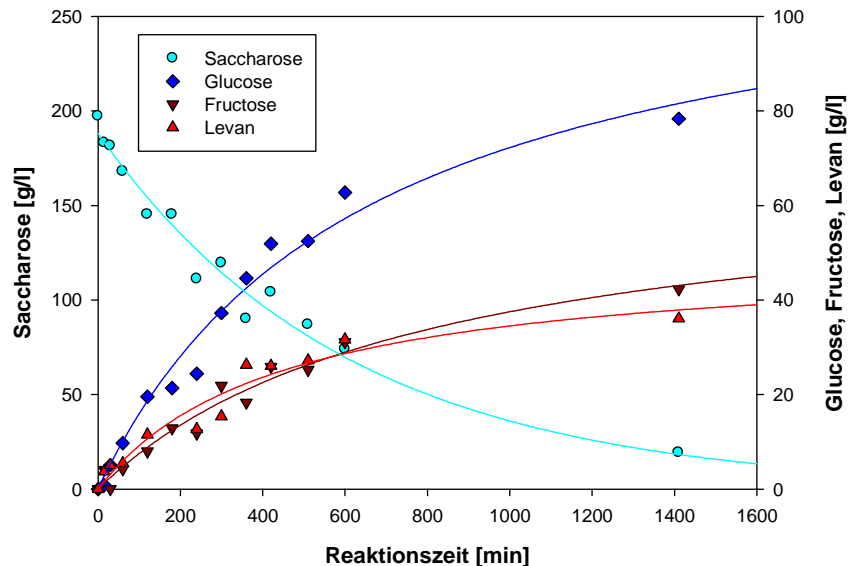


Abb. 5.5.2: Quantitative HPAEC-Analyse der Substratreaktion von recFTF_{His} mit 580 mM Saccharose in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) bei 37,0 °C.

Aus der Reaktion mit Saccharose wird neben langkettigem Levan auch Fructose freigesetzt, so dass sich eine Hydrolyse von 45,1 % ergibt. Aus der Polyfructosylierungsreaktion resultieren 36 g/l Levan mit > 3000 kDa. Eine Bildung von FOS ((Fru)₂ bzw. (Fru)₃) wird bei der Reaktion mit Saccharose nur in äußerst geringen Mengen detektiert (vgl. Anhang, Abb. 10.10.1).

5.5.3 Kinetische Charakterisierung der FTF, recFTF_{His} und recFTF_{Strep}

In vorangegangenen Arbeiten sind die kinetischen Eigenschaften der FTF nur in Gegenwart weiterer sekretierter Proteine festgestellt worden (vgl. Abb. 5.3.1). Der Überstand von *B. subtilis* NCIMB 11871 kann daher weitere glycolytisch aktive Proteine enthalten, welche durch unspezifische Aktivitäten eine kinetische Charakterisierung erschweren. Die rekombinante Herstellung in *E. coli* der FTF ermöglicht die Minimierung solcher Aktivitäten. Das Zellextrakt der Negativkontrollen von *E. coli* BL21 und Rosetta zeigen gegenüber Saccharose, Glucose und Fructose keine Transferasereaktionen, so dass die Enzymreaktion eindeutig der recFTF_{His} bzw. recFTF_{Strep} zuzuordnen ist.

Für das Zellextrakt mit der recFTF_{His} wird eine lineare Abnahme der Saccharosekonzentration über 60 min verzeichnet (Abb. 5.5.3 A). Für 1 - 500 mM Saccharose kann nach Michaelis-Menten ein K_M von 7,4 mM sowie ein v_{max} von 0,097 mM/min bestimmt werden (Abb. 5.5.3 B).

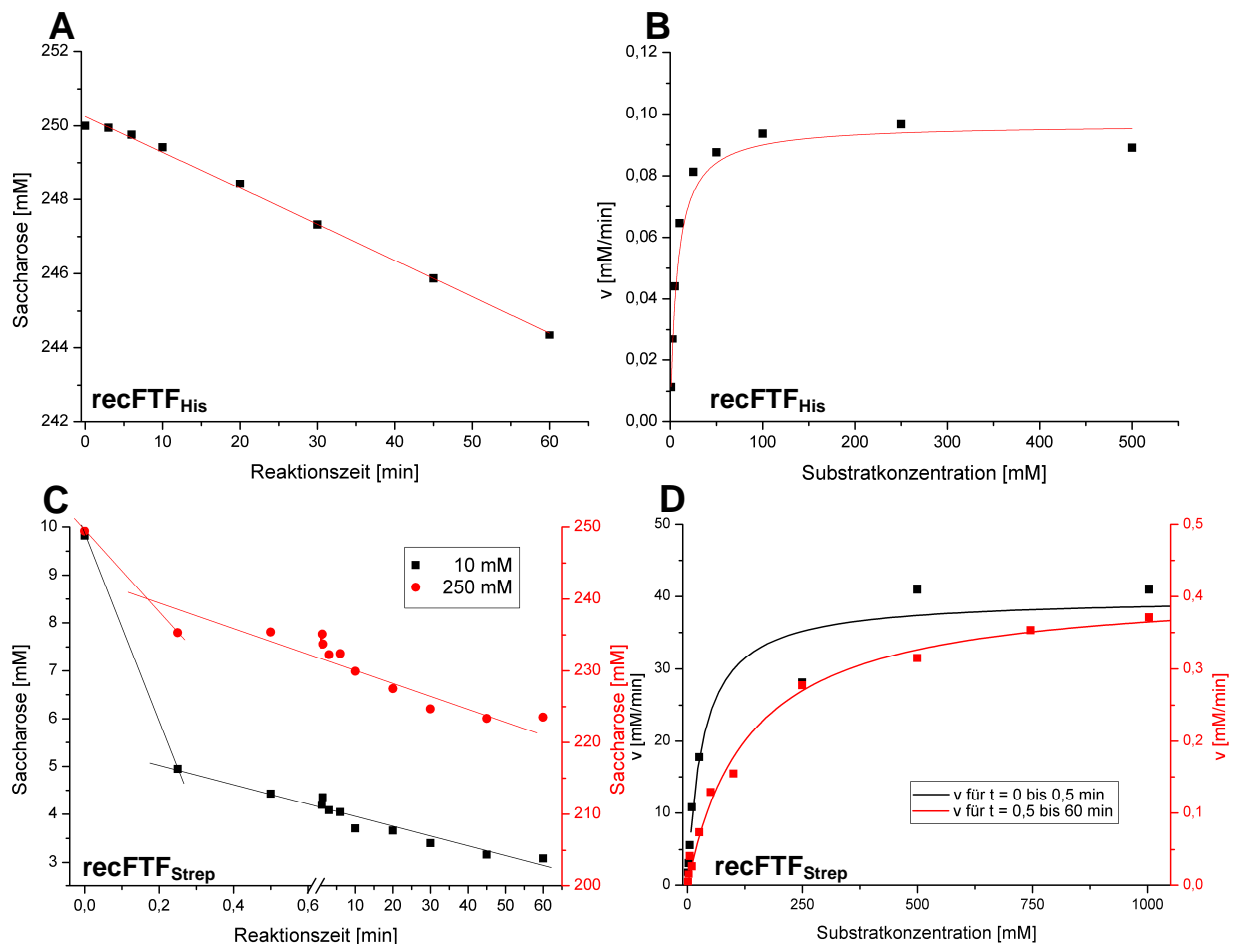


Abb. 5.5.3: Saccharoseumsatz und Enzymkinetik nach Michaelis-Menten für die *recFTF_{His}* (18 ng/Ansatz) und *recFTF_{Strep}* (5 μ g/Ansatz): A: Reaktion mit 250 mM Saccharose für die *recFTF_{His}*; B: Michaelis-Menten-Graph der *recFTF_{His}* (K_M : 7,4 mM; v_{max} : 0,097 mM/min); C: Reaktion mit 10 und 250 mM Saccharose für die *recFTF_{Strep}*; D: Michaelis-Menten-Graph der *recFTF_{Strep}* für $t = 0 - 0,5$ min (K_M : 33,3 mM; v_{max} : 39,87 mM/min) und $t = 0,5 - 60$ min (K_M : 132,3 mM; v_{max} : 0,41 mM/min).

Die Saccharoseumsatzung durch die reine *recFTF_{Strep}* erfolgt in den ersten 15 - 30 Sekunden deutlich schneller als für die restliche Reaktionszeit. Der Konzentrationsabfall wird am Beispiel der Reaktion mit 10 bzw. 250 mM Saccharose gezeigt (Abb. 5.5.3 C). Mit steigender Saccharosekonzentration wird zudem der Konzentrationssprung größer und zeigt bis zu einer Konzentration von 1 M Saccharose keinen Grenzwert. Bei dem Konzentrationssprung wird im Schnitt 18 % weniger Glucose freigesetzt als Saccharose verbraucht. Für den folgenden Reaktionsverlauf beträgt diese Differenz nur noch 2 %. Für die Zeit bis 0,5 min werden etwa 10-fach höhere Reaktionsgeschwindigkeiten als für die weitere Reaktion gemessen. Die separate Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeiten führt in Abb. 5.5.3 D zu zwei Substratkinetiken nach Michaelis-Menten. Aus den Ergebnissen lässt sich für $t \leq 0,5$ min ein K_M von 33,3 mM und ein v_{max} von 39,87 mM/min berechnen. Im Gegensatz dazu resultiert für $t > 0,5$ min ein K_M von 132,3 mM und v_{max} von 0,41 mM/min.

Die renaturierte IB-recFTF_{Strep} bewirkt im Gegensatz zur wt-FTF und recFTF_{His} einen signifikanten Konzentrationssprung. Dies Phänomen beeinflusst die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit deutlich und kann in erster Linie auf die niedrigere Enzymkonzentration der wt-FTF und recFTF_{His} zurückzuführen sein. Zudem können Fehlfaltungen bei der Renaturierung mittels Dialyse im Vergleich zur bakteriell gefalteten Konformation den Reaktionsmechanismus beeinträchtigen.

Nach Hartley und Kilby (1954) lässt sich der sprungartige Substratverbrauch auch auf den Ping-Pong-Mechanismus zurückführen, welcher durch die eingesetzten hohen Enzymkonzentrationen deutlich verstärkt wird. Demnach zeigen die vereinfachenden Reaktionsbedingungen nach Michaelis-Menten (Kapitel 2.6) nur bei Betrachtung der FTF-Gesamtreaktion ihre Gültigkeit. Bei der Reaktion wird die Produktbildung maßgeblich durch die katalytische Konstante k_2 (Gleichung 2.2; $k_1 \sim k_{-1} \gg k_2$) charakterisiert. Die Transfructosylierung durchläuft jedoch zwei Teilreaktionen, wobei als Zwischenprodukt ein Enzym-Fructosyl-Komplex mit dem Asp86 entsteht. Für den Ping-Pong-Mechanismus (Abb. 2.7.2) kann k_4 entsprechend $k_2 \gg k_4$ geschwindigkeitsbestimmend werden. In der Anfangsphase der Reaktion (pre-steady-state-Phase) ist die Bildung und der Verbrauch von E-Sac und E-Fru ausschlaggebend. Die steady-state Bedingung wird erst mit Ausbildung des thermodynamischen Gleichgewichts für k_4 erreicht. Diese sogenannte Burst-Phase wird von Hartley und Kilby (1954) für eine Serin-Protease beschrieben und durch die Ausbildung eines Intermediates erklärt. Ähnlich dem FTF-Reaktionsmechanismus erfolgt dabei nach Kraut (1977) zunächst ein nukleophiler Angriff, gefolgt von der Ausbildung einer kovalenten Esterbindung und schließlich die Freisetzung in einem zweiten Reaktionsschritt.

Bei der FTF hängt der zweite Reaktionsschritt grundsätzlich von der Affinität und der Konzentration des Fructosylakzeptors ab, dabei stehen H_2O und $Glu(Fru)_n$ in Konkurrenz. Die Reaktionskonstante k_4 teilt sich damit in Hydrolysereaktion $k_{4-Hydro}$ und Polymerisierungsreaktion k_{4-Poly} . Ab 50 mM Saccharose überwiegt der Einfluss von k_{4-Poly} gegenüber der Hydrolyse, so dass sich ein stabiles Gleichgewicht aus Hydrolyse und Polymerbildung einstellt. Bei Anwesenheit eines Monosaccharidakzeptors muss zudem der $k_{4-Akzeptor}$ berücksichtigt werden. Dabei wird in Abhängigkeit von Affinität und Konzentration des Akzeptors die Bildung von Polymer- und Hydrolyseprodukten stark beeinflusst.

In Gegenwart eines guten Akzeptors, wie Xylose oder Galactose, wird die Polymerbildung und Hydrolyse deutlich reprimiert. Für die Reaktion mit Raffinose als Fructosyldonor wird bei Tian und Karboune (2012) für eine Levansucrase aus *Bacillus amyloliquefaciens* ebenso ein Sprung beobachtet.

Die kinetischen Parameter aus der Literatur werden in Tab. 5.5.1 denen der Wildtyp-FTF aus *B. subtilis* NCIMB 11871 sowie deren rekombinante Varianten recFTF_{His} und recFTF_{Strep} gegenübergestellt.

Tab. 5.5.1: Kinetische Parameter von FTFs aus natürlicher und rekombinanter Produktion für die Reaktion mit Saccharose. Literaturvergleich mit FTF, recFTF_{His} und recFTF_{Strep}.

Bezeichnung	v_{\max} [mM/min]	K_M [mM]	k_{cat} [1/s]	k_{cat}/K_M [1/s*mM]
extrazelluläre FTF aus <i>Bacillus subtilis</i>				
FTF aus <i>B. subtilis</i> QB 127 Mäntsälä und Puntala (1982), aufgereinigt	0,13	14,0	85,6	6,1
FTF aus <i>B. subtilis</i> NCIMB 11871 Baciu (2005), (Überstand 1-fach konzentriert)	0,124	14,0 ⁽¹⁾	1,1*10 ⁴	796,4
FTF aus <i>B. subtilis</i> NCIMB 11871 (Überstand 1-fach konzentriert aus S3) ⁽²⁾	0,00389	14,0 ⁽¹⁾	3306,1	236,2
rekombinante FTF				
FTF aus <i>B. subtilis</i> QB 252 in <i>E. coli</i> XL1B Chambert und Petit-Glatron (1991), aufgereinigt	1,0*10 ⁻⁸	4,0	35,0	8,5
FTF aus <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> BL21 Ortiz-Soto <i>et al.</i> (2008), aufgereinigt	-	8,0	164,6	20,3
recFTF _{His} in <i>E. coli</i> BL21 (Proteinüberstand aus Aufschluss) ⁽²⁾	0,097	7,4	4,9*10 ⁶	6,6*10 ⁵
recFTF _{Strep} in <i>E. coli</i> Rosetta (Proteinüberstand aus Aufschluss) ⁽²⁾	9,52	69,7	1,6*10 ⁵	2349,2
recFTF _{Strep} in <i>E. coli</i> Rosetta (aufgereinigt aus IBs, Reaktion bis 0,5 min)	39,87	33,3	6,9*10 ⁶	2,1*10 ⁵
recFTF _{Strep} in <i>E. coli</i> Rosetta (aufgereinigt aus IBs, Reaktion von 0,5 bis 60 min)	0,41	132,3	7,1*10 ⁴	535,8

⁽¹⁾ K_M aus Mäntsälä und Puntala (1982); ⁽²⁾ FTF-Konzentration im Proteinüberstand näherungsweise durch densitometrische Messung im SDS-Gel erfasst

Für eine wt-FTF aus *B. subtilis* QB 127 wird von Mäntsälä und Puntala (1982) ein K_M von 14 mM und ein v_{\max} von 0,13 mM/min angegeben. Unter der Annahme dieses K_M -Wertes zeigt sich, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der wt-FTF kleiner als die von Baciu (2005) ermittelte ist. Für die aufgereinigte recFTF_{Strep} ergeben sich um 10² - 10⁵ höhere k_{cat} -Werte als in der Literatur.

Für die recFTF_{His} ist der K_M mit 7,4 mM vergleichbar mit den in Literatur angegebenen Werten von 4,0 - 16,8 mM (Ortiz-Soto *et al.*, 2008; Euzenat *et al.*, 1997; Mäntsälä und Puntala, 1982; Vaidya und Prasad, 2012; Chambert und Petit-Glatron, 1991). Bei dem Vergleich der Proteinüberstände von His-Tag mit der Strep-Tag Variante zeigt sich eine 9,4-fache Erhöhung des K_M -Wertes auf 69,7 mM.

Der Vergleich enzymkinetischer Parameter zeigt für die Extrakte der recFTF_{His} und der recFTF_{Strep} sowie der resolubilisierten IB-recFTF_{Strep} Unterschiede bei den v_{\max} - und K_M -Werten. Die resolubilisierte recFTF_{Strep} weist mit dem K_M -Wert von 132,3 mM für 0,5 - 60 min einen doppelt so hohen Wert als die im Zellextrakt gelöste FTF auf, was auf Fehlfaltungen der recFTF hindeutet. Da trotz der deutlich geringeren FTF-Konzentration im Zellextrakt eine 23 mal höhere maximale Reaktionsgeschwindigkeit gemessen wird, beinhaltet die rückgefaltete IB-FTF_{Strep} auch inaktives lösliches Enzym. Beim Proteinextrakt kann der Wirtsproteinanteil eine stabilisierende Wirkung auf die Faltung bzw. die Aktivität der FTF haben. Zudem können leichte konformale Fehlfaltungen der Subsite +1 und +2 die Adhäsion des gebildeten Levans und damit die Koordination des Fructosylakzeptors einschränken.

Der Proteinüberstand der gelösten recFTF_{Strep} hat aufgrund der stärkeren Expression ein höheren v_{\max} -Wert als die recFTF_{His}. Jedoch fällt auch der K_M -Wert etwa 9-fach höher aus, was durch sterische Beeinträchtigung des 1,5 kDa großen Strep-Tags hervorgerufen sein kann. Die Entfernung des Strep-Tags und eine weitere Optimierung der IB-Rückfaltung kann zur Verbesserung der enzymkinetischen Parameter beitragen.

Die hohen Unterschiede bei der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) ergeben sich indirekt aus der Abhängigkeit von k_{cat} zur eingesetzten FTF-Konzentration. In Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis aus Enzym zu Fructosyldonor und zu Fructosylakzeptor resultieren unterschiedliche Anteile von Hydrolyse, Rückreaktion und Akzeptorreaktionen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit steht damit unter dem thermodynamischen Einfluss verschiedener Affinitäten, was sich besonders bei hohen Enzymkonzentrationen bemerkbar macht.

Zur Ermittlung der Aktivitäten von der recFTF_{Strep} wird die Reaktionsgeschwindigkeit für $t \geq 0,25$ min herangezogen. Diese ist in Bezug auf den geschwindigkeitslimitierenden Reaktionsschritt mit der recFTF_{His} und wt-FTF vergleichbar. Zudem sind die Werte reproduzierbar und unterliegen einer deutlich geringeren Fehlerschwankung.

5.5.4 Bilanzierung der recFTF-Reaktion mit Saccharose

Die Bilanzierung der Edukt- und Produktstoffmengen wird auf eine vollständige Saccharoseumsetzung zu Polyfructosiden bezogen. Für den Bereich von 5 - 250 mM Saccharose zeigt sich eine exponentielle Abnahme des verbrauchten Saccharoseanteils (Abb. 5.5.4 A). Daraus ergibt sich für die polymerisierte Fructose in Bezug auf die verbrauchte Saccharose Optimum bei ~ 250 mM Saccharose. In Bezug auf die Zeit ergibt sich für 50 mM Saccharose die maximale Produktausbeute von 17,7 %. Die größten Stoffmengen an Polyfructosid werden mit bis zu 12,3 mM/h im Bereich von 250 - 1000 mM erzielt.

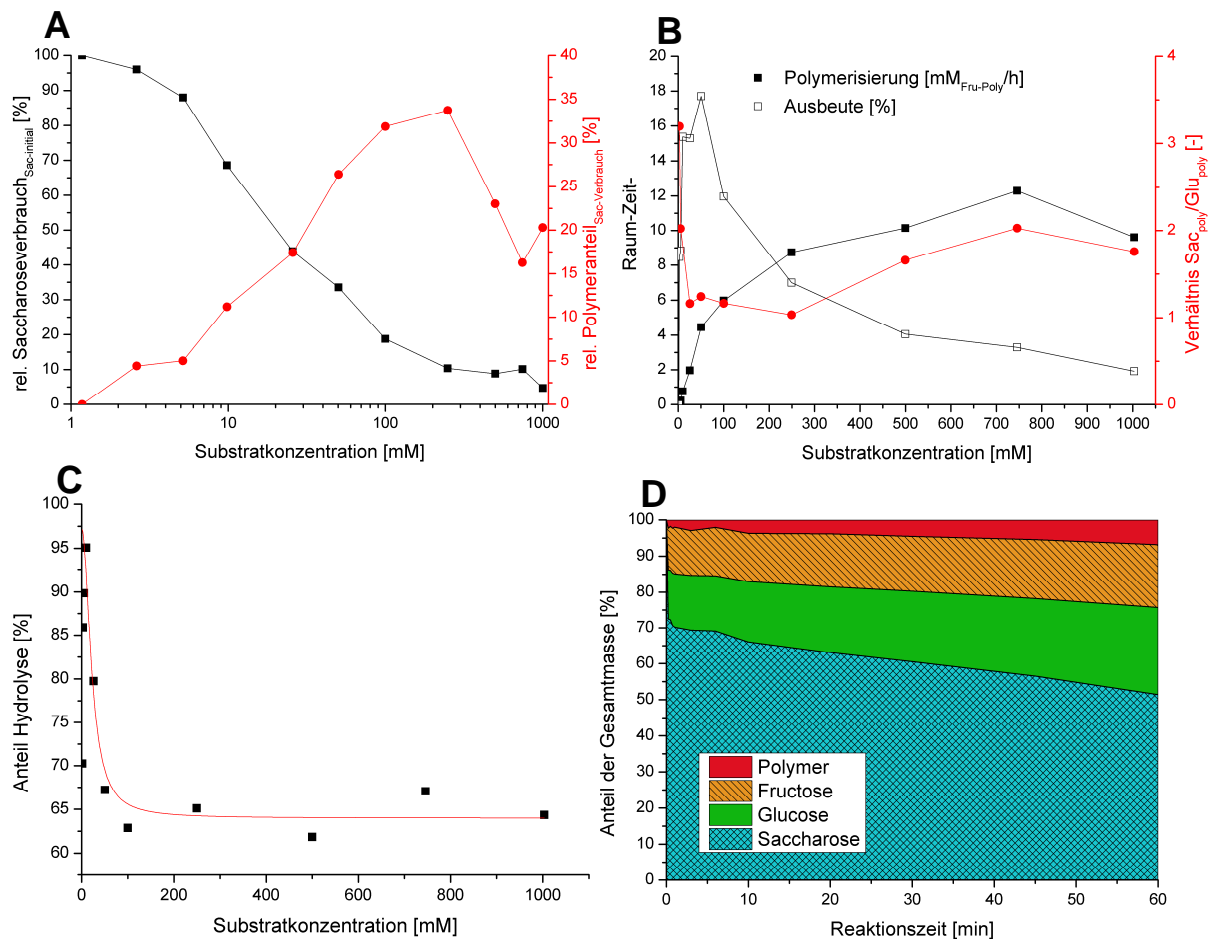


Abb. 5.5.4: Bilanzierung der Transfructosylierung für $9,6 \cdot 10^{-8}$ mM recFTF_{Strep}: A: relativer Anteil an verbrauchtem Substrat (schwarz); relativer Anteil polymerisierter Fructose in Bezug auf die verbrauchte Saccharose (rot); B: Raum-Zeit-Ausbeute und -Fructosylierung (schwarz); polymerisierte Saccharose zu polymerisierter Fructose (rot); C: Anteil der Hydrolyse; D: Massenbilanz für Ausbeute Maximum (50 mM Saccharose).

Die zur Polymerisation verbrauchte Saccharose kann im Verhältnis zur polymerisierten Fructose Hinweise auf die Effektivität der Transfructosylierung bzw. die Kettenlänge geben. Bei der recFTF_{Strep} werden für den Bereich von 25 - 205 mM Saccharose im Schnitt 6,7 Fructosyleinheiten an einen Saccharosekopf (Glu-Fru) transferiert (Abb. 5.5.4 B). Bei der Levansucrase aus *Erwinia amylovora* wächst mit steigender Saccharosekonzentration die Transglycosylierungsaktivität von 60 auf 94 % an, wobei die höchste Bildung von FOS bei 200 mM Saccharose und von langkettigem Levan bei > 500 mM beobachtet wird (Caputi *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu zeigen sich für die recFTF_{Strep} für ≥ 500 mM Saccharose tendenziell kürzere Fructosylierungsprodukte. Beim Einsatz sehr hoher FTF-Enzymkonzentrationen werden nach Beine (2009) deutlich mehr längerkettige Polyfructoside angereichert, so dass die Ausbeute im Wesentlichen vom Verhältnis Enzym:Donor:Akzeptor abhängt. Das Produktspektrum kann auch durch die Temperatur und Ionenstärke beeinflusst werden. Nakapong *et al.* (2013) reduziert das Molekulargewicht von Levan bei einer LS aus *Bacillus licheniformis* durch eine Temperaturabsenkung von 50 auf 30 °C sowie durch die Zugabe von NaCl (0,5 M) von 612 kDa auf 11 kDa.

Die FTF bildet mit Saccharose primär Levan. Mit einer Saccharosekonzentration von ≥ 250 mM werden auch geringfügige Mengen 6-Kestose und 6-Nystose festgestellt.

Für Saccharosekonzentrationen ≤ 25 mM kann ein deutlicher Anstieg der Hydrolyse bis auf 95 % festgestellt werden (Abb. 5.5.4 C). Bei kleinen Saccharosekonzentrationen von < 12 mM zeigt die Levansucrase aus *B. subtilis* ausschließlich hydrolytische Aktivität (Chambert *et al.*, 1974). Für die recFTF_{Strep} liegt der Anteil der Hydrolyse für ≥ 50 mM Saccharose relativ konstant bei etwa 65 %. Im Vergleich dazu zeigt die Levansucrase aus *B. subtilis* bei Moraru (2006) eine Saccharosehydrolyse von 52 % bei der Gal-Fru-Reaktion. Die Levansucrase aus *B. megaterium* zeigt mit 50 % etwas weniger Hydrolyse (Beine *et al.*, 2009). Beine *et al.*, 2009 konnte eine verstärkte Hydrolyse während der Reaktionsanfangsphase feststellen und postuliert, dass sich die Transfructosylierung erst durch die zunehmende Anreicherung vom Akzeptor (Levan) verstärkt. Damit hat auch die freigesetzte Glucose einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion.

Exemplarisch für die recFTF_{Strep}-Reaktion zeigt die Massenbilanz für 50 mM Saccharose mit 18 % die höchste Ausbeute an Polyfructosid und einen konstanten Hydrolyseanteil von 67 % (Abb. 5.5.4 D). Bereits nach 0,25 min sind 28 % der Saccharose verbraucht und 2,3 % Produkt gebildet.

5.5.5 Einfluss von Glucose auf die Reaktion mit Saccharose

Für die Levansucrase aus *B. subtilis* wird die Produktausbeute an Levan durch in Gegenwart von Glucose verringert (Hestrin *et al.*, 1943).

In Gegenwart von Glucose verringert sich die Polymerisierungsgeschwindigkeit deutlich und zeigt das Verhalten einer Inhibierung (Abb. 5.5.5). Dabei ergibt sich eine kompetitive Inhibierung aus der Belegung der Pyranosylbindestelle. Die Geschwindigkeit nimmt bereits bei Anwesenheit von 5 % Glucose um 21% ab. Auch die Levansucrase aus *Aerobacter levanicum* zeigt bei Anwesenheit von 4% Glucose eine deutlich geringe Produktbildung (Hestrin und Avineri-Shapiro, 1944).

Ab einem Anteil von 10 % Glucose (50 mM) beträgt die Polymerisierungsgeschwindigkeit v_{Poly} nur noch 50 %. Analog dazu hat sich das Gleichgewicht zur Hydrolyse verschoben, so dass 15 bzw. 33 % mehr Fructose in der Reaktion freigesetzt werden. Die Zugabe von Glucose verschiebt das Quasi-Gleichgewicht zur Rückreaktion und erhöht damit in der Folge den Anteil der Hydrolyse. Die Levansynthese steht in direkter Konkurrenz zur Akzeptor- bzw. Rückreaktion mit der Glucose. Die Anwesenheit von Glucose kann in Abhängigkeit von der Akzeptorstärke und -konzentration signifikante Ausbeuteverluste hervorrufen.

Bei 30-fachem molaren Überschuss zeigt sich bei 16 % Glucose eine vollständige Inhibierung. Hettwer *et al.* (1995) zeigen für eine *Pseudomonas* Levansucrase schon in Gegenwart von 30 mM Glucose eine vollständige Inhibierung auf. Die Glucoseinhibierung kann bei der Darstellung der Gesamtreaktion nach Beine *et al.* (2009) als Akzeptorreaktion

integriert werden, da ein Inhibierungstherm keine nennenswerte Verbesserung bei der Modellierung zeigt (Zwerenz, 2012). Für sehr hoch konzentrierte Lösungen an Saccharose und zugleich FTF kann die Burst-Freisetzung von Glucose einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit haben.

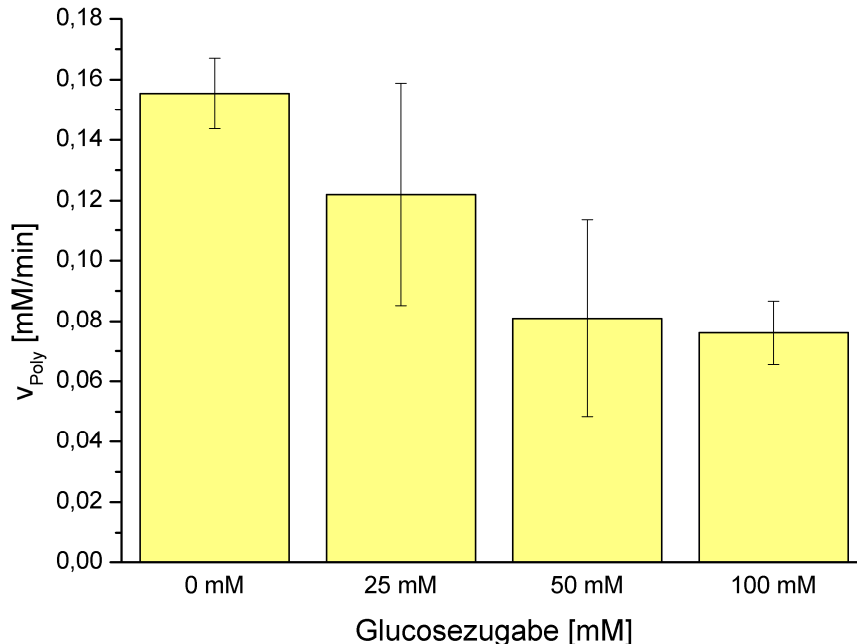


Abb. 5.5.5: Mittlere Reaktionsgeschwindigkeit für polymerisierte Fructosylreste unter Standardbedingungen bei Anwesenheit von Glucose.

Das Entziehen von Glucose aus dem Reaktionsraum, beispielsweise mittels einer weiteren enzymatischen Reaktion, kann die Wirkung der Konkurrenzreaktion mindern. Szewngiel *et al.* (2007) senken auf diese Weise für eine FTF aus *B. subtilis* DSM 347 mittels einer membrangebundenen Hefe den Glucosegehalt im Reaktionsraum um 16 %, so dass die Effizienz der Levansynthese um 11 % ansteigt. Auch Beine *et al.* (2009) zeigen, dass durch mikrobiellen Glucoseentzug höhere Produktausbeuten zu erzielen sind, aber aufgrund der physiologischen Wachstumsbedingungen des Glucoseverwerter nur kleine Zuckerkonzentrationen von maximal 50 g/l Gesamtzucker eingesetzt werden können. Alternativ kann auch Raffinose als Fructosyldonor eingesetzt werden (Seibel *et al.*, 2006 b), wobei die freigesetzte Melibiose ein schlechteren Akzeptor als Glucose darstellt.

5.5.6 Bildung von den Akzeptorprodukten Galactosyl- und Xylosylfructosid

Die eingesetzten Akzeptoren D-Galactose und D-Xylose werden von der FTF vorwiegend in α -Glucopyranosyl-(1,2)- β -Fructofuranosid-Konfiguration verknüpft. Gegenüber der Reaktion mit Saccharose wird die Levanbildung durch den Akzeptor reprimiert, so dass kurzkettige Akzeptor-FOS mit hohen Ausbeuten gebildet werden. Sowohl Galactose als auch Xylose zeigen besonders gute Akzeptoreigenschaften (Baciu *et al.*, 2005; Seibel *et al.*, 2005; Seibel *et al.*, 2006 b). Das Gleichgewicht der Reaktion wird stark zur Bildung von Saccharose-derivat verschoben. Das Produkt Gal-Fru und Xyl-Fru liegt nach der Aufreinigung in 100 %

Reinheit vor (Seibel *et al.*, 2005; Anhang 10.13.2 und 10.13.2) und wird als Massenstandard eingesetzt.

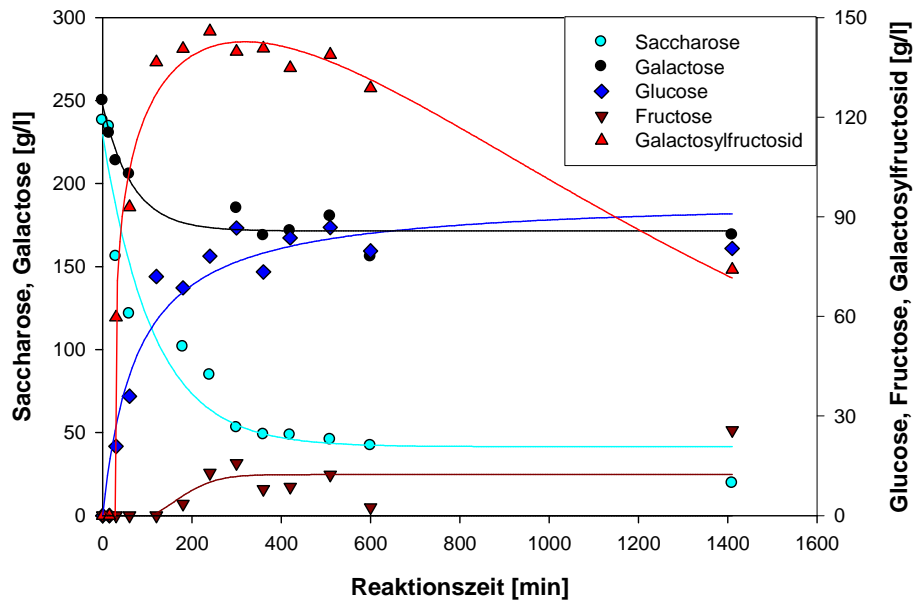


Abb. 5.5.6: Akzeptorreaktion mit Galactose:Saccharose (1,4 M_{Gal}:0,7 M_{Sac}) mit der recFTF_{His} (1,2 U/ml) unter Standardbedingungen. DC im Anhang, Abb. 10.12.1.

Der Einsatz des wt-FTF Überstandes birgt zwar den Vorteil, dass sich durch die geringe Enzymkonzentration nach Beine (2009) weniger langkettige FOS und Hydrolyseprodukte anreichern. Jedoch ist Reaktionsdauer mit 50 und 100 h sehr lang und dabei das Produktmaximum durch die Denaturierung Enzyms limitiert (vgl. Anhang 10.11). Auch wenn die extrazelluläre Levansucrase nach Petit-Glatron *et al.* (1980) wenig sensitiv auf diverse Proteasen reagiert, kann die Reaktionszeit durch den Einsatz der höher konzentrierten, rekombinant hergestellten FTF reduziert und so der Einfluss einer thermischen Inaktivierung minimiert werden.

Vom Produktmaximum ausgehend kann mit der recFTF_{His} die Reaktionszeit auf 8 % der wt-FTF-Reaktionszeit verkürzt werden (Abb. 5.5.6). Das Saccharosederivat reagiert im weiteren Reaktionsverlauf zu höheren Oligosacchariden. Das Produktmaximum beinhaltet mit 61% eine 3-fach höhere Ausbeute als beim wt-Überstand. Zudem verbleibt 4 mal weniger Restsaccharose in der Reaktionslösung, was die Aufreinigung des Saccharosederivates erleichtert.

Die Xylose-Akzeptorreaktion der recFTF_{His} zeigt im Vergleich zur Galactose-Akzeptorreaktion einen ähnlichen Reaktionsverlauf. Die Reaktionszeit verkürzt sich dabei auf 10 % der benötigten Zeit mit der wt-FTF.

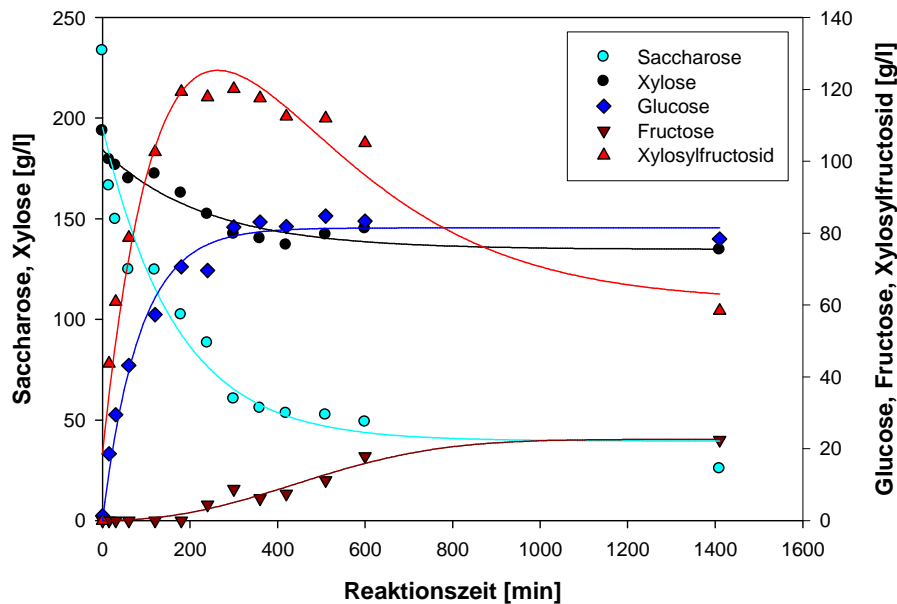


Abb. 5.5.7: Akzeptorreaktion mit Xylose:Saccharose (1,3 M_{Xyl} :0,65 M_{Sac}) mit der recFTF_{His} (1,2 U/ml) unter Standardbedingungen. DC im Anhang, Abb. 10.12.2.

Nach Seibel *et al.* 2006 b ergeben sich im struktursystematischen Vergleich zu anderen Monosaccharidakzeptoren die besten Akzeptoreigenschaften für Galactose und Xylose. Bei der Transfructosylierung kann eine 32-fach höhere Reaktionskonstante für Galactose als für Saccharose festgestellt werden (Beine *et al.*, 2009). Die Affinität der Saccharose liegt mit einem K_M von 7,4 mM (14 mM nach Mäntsälä und Puntala, 1982) höher als für Gal-Fru (20,3 mM) bzw. Xyl-Fru (28,5 mM) nach Beine *et al.* (2008). Die Übertragung auf einen zusätzlichen Akzeptor ermöglicht Ausbeuten von > 50 %. Gal-Fru wird in sukzessiv aufgebauten und konzentrationsabhängigen Folgereaktionen zu höheren Oligosacchariden des Typs Gal(Fru)_n umgesetzt (Beine *et al.*, 2008). Durch die Rückreaktion steht das gebildete Saccharosederivat zunehmend in einer Donatorkonkurrenz zur Saccharose. Das Saccharosederivat kann auch als Substrat eingesetzt werden.

Die rekombinante Produktion ermöglicht den Einsatz deutlich höherer Konzentrationen an FTF. Für die Akzeptorreaktion mit Galactose ergibt sich aus der Reaktionsbeschleunigung eine Effizienzmaximierung (Tab. 5.5.2). Das thermodynamische Gleichgewicht bestimmt auf der Basis der Konzentrationsgewichtung von recFTF, Saccharose und Akzeptor den Verlauf der zueinander konkurrierenden Reaktionen. Bei hohen Enzymkonzentrationen verschiebt sich das Produktspektrum jedoch stark zu den polymeren Produkten. Ein Produktmaximum fällt aufgrund der schnellen Weiterreaktion dadurch deutlich geringer aus. Die kinetische Modellierung ermöglichte bei der Akzeptorreaktion mit Galactose durch Variation der Konzentration an Enzym, Donator und Akzeptor eine Optimierung der Produktausbeute und Produktreinheit (Beine *et al.*, 2009).

Tab. 5.5.2: Vergleich der Enzymfraktionen wt-FTF, recFTF_{His} und recFTF_{Strep} in der Akzeptorreaktion mit 1M Gal / 0,5 M Sac bis zum Erreichen des Gal-Fru-Maximums (Reaktionszeit).

Probe	Reaktionszeit [h]	Raum-Zeit-Ausbeute [g/(lh)]	Beschleunigung
Nativer Kulturüberstand	72,0	1,5	1
50-fach konzentrierter Kulturüberstand	7,5	14,5	9,6
10-fach konzentrierter <i>E. coli</i> Überstand mit recFTF _{His}	0,2	540,0	360
<i>E. coli</i> mit recFTF _{Strep} aus inclusion bodies	0,005	n.m.*	14400

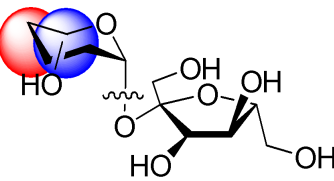
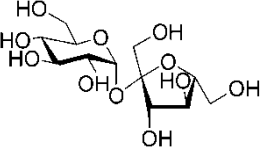
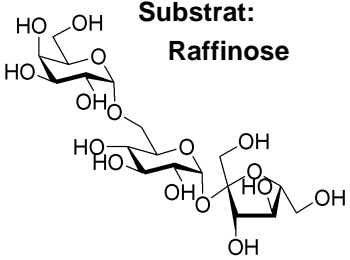
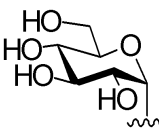
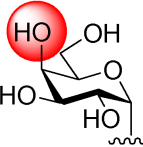
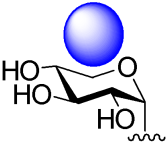
* durch die hochaktive recFTF_{Strep} wird das Produktspektrum stark verschoben, so dass die Angabe einer Raum-Zeit-Ausbeute nicht sinnvoll ist.

Die recFTF_{His} zeigt bei der Synthese von Polyfructan aus den Substraten Saccharose und Raffinose ein vergleichbaren Reaktionsverlauf (Tab. 5.5.3). Dabei wird der Fructosyldonor fast vollständig umgesetzt. Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit entspricht bei beiden Substraten etwa 0,50 mM/min.

Im Gegensatz zur LS aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Tian und Karboune, 2012) zeigt die recFTF_{His} bei Raffinose für k_{Poly} keine Limitierung. Raffinose weist eine zur Saccharose adäquate Selektivität und Transfructosylierungsgeschwindigkeit auf und kann alternativ als Fructosyldonor eingesetzt werden. Allerdings verlängert sich die Reaktionszeit bis zum Ausbeutemaximum für Gal-Fru um den Faktor 2,1 und für Xyl-Fru um den Faktor 1,4. Bei ähnlicher Selektivität wie die Saccharose ist die Bindestelle durch Raffinose länger blockiert bzw. konkurriert verstärkt mit dem Akzeptor bzw. dem Akzeptorprodukt. Die Anlagerung der Raffinose an die Subsite +1/+2 erfolgt über eine Wasserstoffbrücke zur C6-Hydroxylgruppe des Galactoserestes (Beine *et al.*, 2008; Meng und Fütterer, 2008). Daraus erklärt sich zudem die geringere Ausbeute an Gal-Fru, da dieses aufgrund struktureller Ähnlichkeit stärker als Xyl-Fru um die Bindestelle des Galactosylrestes konkurriert. In der Folge ist für die Gal-Fru-Reaktion Raffinose ein schlechterer Fructosyldonor als Saccharose.

Die Bildung von Xyl-Fru mit Raffinose verläuft adäquat zur Reaktion mit Saccharose, was zu einer vergleichbaren Ausbeute von 82,2 % führt. Raffinose ist als Polymerisierungsinitiator bei der Bildung von Xyl-Fru besser als Saccharose geeignet. Raffinose führt bei einer LS aus *B. amyloliquefaciens* zu einer verstärkten Polymerisation gegenüber der Oligomerisation, was zu einer 44 % höheren Transfructosylierung und 30 % mehr Polysaccharid führt (Tian und Karboune, 2012).

Tab. 5.5.3: Enzymatische Synthese von Polyfructan und den Saccharoseanaloga Gal-Fru bzw. Xyl-Fru mit unterschiedlichen Fructosyldonatoren (Saccharose bzw. Raffinose).

Produkt: → FOS/Levan → Gal-Fru → Xyl-Fru 	Substrat: Saccharose 	Substrat: Raffinose 
	Zeit [min] Umsatz [%] Ausbeute am Optimum [g/l (%)]	Zeit [min] Umsatz [%] Ausbeute am Optimum [g/l (%)]
→ FOS/Levan  <i>v</i> _{Bildung-initial} [mM/min] Selektivität [-]	Levan 1410 90,3 36,0 (34,8) 0,53 0,39	Levan 1560 98,1 35,9 (37,9) 0,50 0,39
→ Gal-Fru  <i>v</i> _{Bildung-initial} [mM/min] Selektivität [-]	Gal-Fru 240 64,4 145,8 (61,3) 4,52 0,95	Gal-Fru 510 72,7 99,7 (55,7) 1,15 0,77
→ Xyl-Fru  <i>v</i> _{Bildung-initial} [mM/min] Selektivität [-]	Xyl-Fru 300 74,1 120,1 (56,4) 3,89 0,76	Xyl-Fru 420 76,9 138,3 (82,2) 1,93 1,07

Die hohe Affinität zu Akzeptor bzw. Polyfructan kann begünstigend auf die Ausbildung einer katalytisch aktiven Proteinkonformation wirken. Die Polymeranlagerung an die Enzymoberfläche ist wahrscheinlich, da extrazelluläre Fructosyltransferasen oftmals aus polysaccharidhaltigen Plaques isoliert werden (Birkhed, 1975; Rølla *et al.*, 1983; Vacca Smith und Bowen, 2000; Steinberg *et al.*, 2002). Das Anheftungsverhalten kann auch verstärkt zur Ausbildung multimerer Komplexe führen, die in Studien von Bronsteyn und Steinberg (2002) sowie Petit-Glatron *et al.* (1980) beobachtet wurden.

Die Akzeptorreaktionen zeigen 2,3 - 8,5-fach höhere Anfangsgeschwindigkeiten als die Saccharosereaktion. Die Selektivität der Akzeptorreaktion erhöht sich von 39 % Transfructosylierungsprodukt auf 76 bis etwa 100 % bei der Bildung von Gal-Fru und

Xyl-Fru. Die Akzeptoren Galactose und Xylose weisen gegenüber der Saccharose bzw. Raffinose eine höhere Affinität zur Akzeptorbindestelle auf. Bei starkem Überschuss des Akzeptors wird $k_{4\text{-Akzeptor}} > k_{4\text{-Poly}}$ und verändert damit das Reaktionsgleichgewicht zu einer verstärkten Transfructosylierung.

Exponierte Aminosäurereste der Subsite +1 bilden Wasserstoffbindungen zu den Hydroxylgruppen des Akzeptors aus, um diesen entscheidend für die Reaktion zu positionieren und zu stabilisieren. In Akzeptorreaktionen kann durch die Variation der Ausrichtung funktioneller Gruppen sowie bei *in silico* Akzeptordockings gezeigt werden, dass die Stellung der C4 und C6-Gruppen die Umsatzraten am wenigsten beeinflussen und zudem die niedrigsten Docking-Energien aufweisen (Seibel *et al.*, 2006 b). Die Abweichungen zur Glucose bestehen für die D-Galactose in der axialen Ausrichtung der Hydroxylgruppe am C4 und bei der D-Xylose durch das Fehlen der Hydroxymethylgruppe am C6. Neben D-Fucose (C4/C6) weisen daher auch die C6-Disaccharide Isomaltose, Melibiose und das C4-Disaccharid Maltose mit α -(1,4)- α -Bindung sehr gute sowie Cellobiose und Lactose mit β -(1,4)- α -Bindung gute Akzeptoreigenschaften auf (Seibel *et al.*, 2006 b).

Die sukzessive Fructosylierung ermöglicht eine zielgerichtete Synthese von FOS-Derivaten des Levantyps, wobei die endständigen Glycopyranosylköpfe den eingesetzten Saccharoseanaloge entsprechen. Durch die Substitution essentieller Aminosäuren kann die Affinität für wachsende FOS verändert werden. Durch die Mutation der SacB in N242H an der Subsite +2 verliert das Enzym aufgrund der fehlenden C6-Stabilisierung seine Polymerisierungsfähigkeit und kann lediglich bei Xyl-Fru eine weitere Fructosylierung zu Xyl-Fru₂ durchführen (Beine *et al.*, 2008; Homann *et al.*, 2007; Strube *et al.*, 2011). Eine Polyfructosylierung kann auch durch Substitution von R360H (Chambert und Petit-Glatron, 1991) bzw. R370A durch Homann *et al.* (2007) inhibiert werden, was im ersten Fall zur Anreicherung von Kestose und im zweiten Fall zur Anreicherung von Neokestose mit β -(2,6)- α -Bindung und deren C1-Spaltprodukt Blastose führt. Diese und weitere Veränderungen im Netzwerk der AS-Wechselwirkungen beeinflussen wesentlich die Affinität des Fructosylakzeptors und können die Spezifität der Reaktion erweitern.

5.5.7 Transferase- und Hydrolyseaktivität bei der Substrat- und Akzeptorreaktion

Durch die Gegenwart des Akzeptors Galactose bzw. Xylose kann im Vergleich zur Saccharosereaktion nicht nur eine Beschleunigung bei der Bildung der Saccharosederivate sondern auch eine signifikante Änderung der Transferase- und Hydrolyseaktivität beobachtet werden (Tab. 5.5.4).

Tab. 5.5.4: Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die recFTF_{His} bei der Reaktion mit Saccharose, der Galactose- sowie Xylose-Akzeptorreaktion.

Protein (Substrat:Akzeptor)	U _T [U/l]	U _H [U/l]	U _T /U _H [-]
recFTF _{His} (Saccharose)	6940	5250	1,3
recFTF _{His} (Sac:Gal; 1:2 molar)	59320	3840	15,4
recFTF _{His} (Sac:Xyl; 1:2 molar)	51070	1920	26,6

Die Transferaseaktivität für die Akzeptorreaktion mit Galactose bzw. Xylose steigt gegenüber der Saccharosereaktion um den Faktor 8,5 bzw. 7,4 an, während die Hydrolyseaktivität mit Galactose um 27 % und Xylose um 63 % sinkt. Das U_T/U_H-Verhältnis verschiebt sich von 1,3 bei der Saccharosereaktion auf 15,4 für die Galactose- und 26,6 für die Xylose-Akzeptorreaktion. Nach Berücksichtigung der Hydrolyse wird bei den Akzeptorreaktionen die 1,7-fache Menge an Transfructosylierungsprodukten verzeichnet.

Für erhöhte Saccharosekonzentrationen wird kein wesentlicher Einfluss auf das Transfructosylierungs-/Hydrolyse Verhältnis festgestellt. Die Bildung von Hydrolyseprodukten sowie von langkettigen Polysacchariden wird durch die Gegenwart eines Akzeptors reprimiert. Der Akzeptor konkurriert mit der deutlich geringer konzentrierten Glucose um die Substratbindestelle für den Glucopyranosylrest, um in der "Glucopyranosylrückreaktion" eine α-(1,2)-β-Bindung zum Pyranosering auszubilden. Die Folgereaktion höherer FOS erfolgt durch die Fructosylierung des Fructofuranoseringes in β-(2,6)-β-Orientierung.

Für die recFTF_{Strep} sinkt das U_T/U_H-Verhältnis bei der Saccharosereaktion auf 0,75, da bei vergleichbarer Transferaseaktivität deutlich mehr Hydrolyseaktivität festgestellt wird.

5.6 Immobilisierung der rekombinanten Fructosyltransferase

Eine ökonomische und prozessorientierte Verwendung kann durch Immobilisierung der IB-recFTF_{Strep} an oder in eine feste Trägermatrix ermöglicht werden. Die Denaturierung gegenüber destabilisierenden Einflüssen wird zudem deutlich vermindert.

5.6.1 Physikochemische Charakterisierung der Adsorbentien Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit

Die Morphologie der verwendeten Trägermaterialien wird durch die rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in Abb. 5.6.1 ersichtlich.

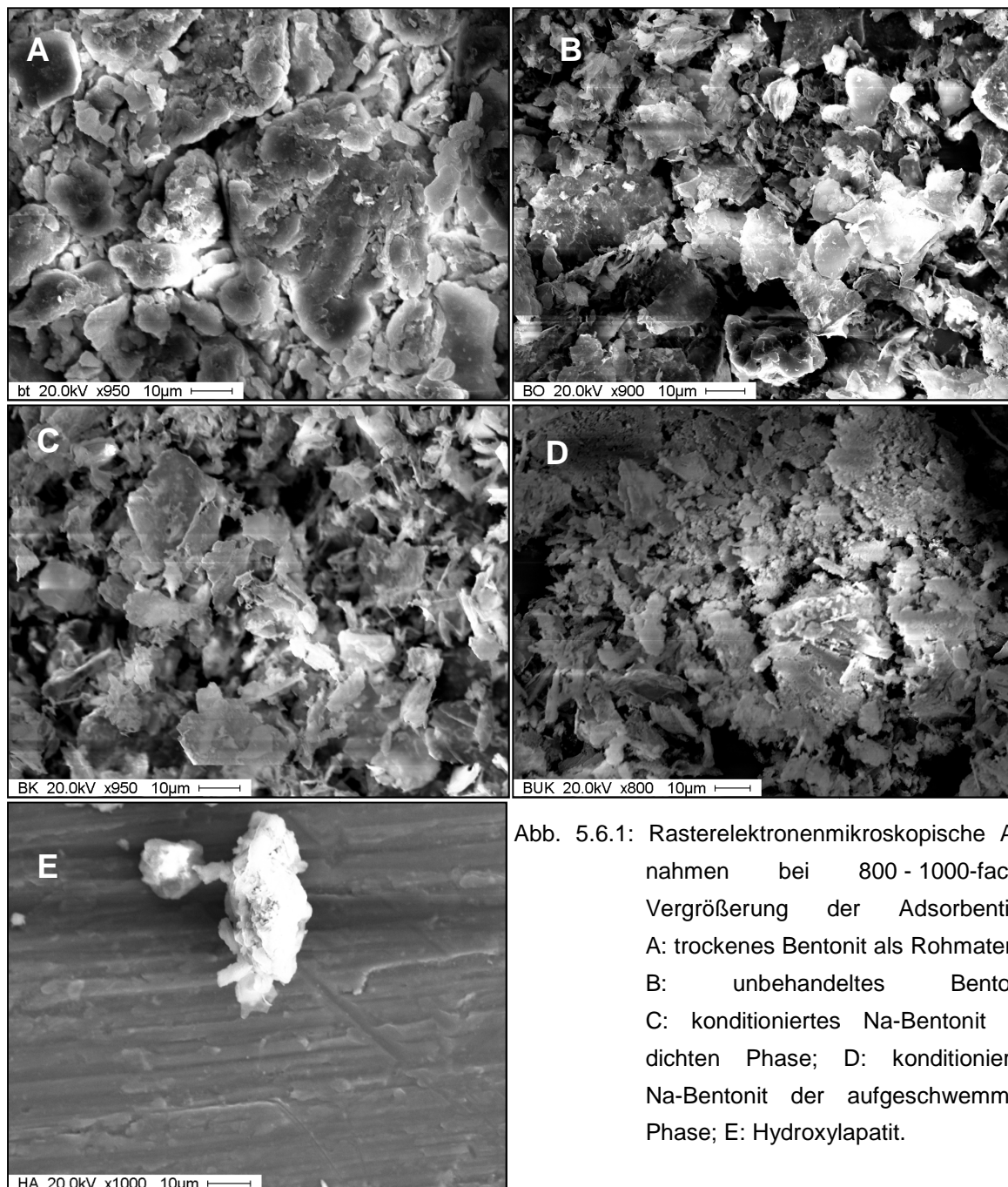


Abb. 5.6.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bei 800 - 1000-facher Vergrößerung der Adsorbentien: A: trockenes Bentonit als Rohmaterial; B: unbehandeltes Bentonit; C: konditioniertes Na-Bentonit der dichten Phase; D: konditioniertes Na-Bentonit der aufgeschwemmten Phase; E: Hydroxylapatit.

Das Rohmaterial des Bentonits liegt in kompakten Partikeln deutlich unterschiedlicher Größe vor (Abb. 5.6.1 A). Die übereinander liegenden Platten des Schichtsilikates zeichnen sich auf den größeren Partikeln durch Abbruchkanten ab. Nach der Quellung und dem Dispergieren in Phosphatpuffer ändert sich die Morphologie des Materials, so dass vorwiegend zerfallene Plättchen vorliegen (Abb. 5.6.1 B). Bei Zentrifugation des Materials entstehen zwei Schichten: eine dichte, tonartige Phase und eine lockere, galertartige Phase. Die Konditionierung durch Na^+ -Ionen bewirkt ein einheitlich toniges Material, welches nach dem Waschen wieder die Phasen aufweist. Nach der Lyophilisation zeigen sich in der tonigen Phase größere, dünne Silikatplättchen (Abb. 5.6.1 C), während die Galert-Phase eher einer spröden Salzkristalle gleicht (Abb. 5.6.1 D). Das Hydroxylapatit zeigt nach der Lyophilisation Agglomerate unterschiedlich großer Primärpartikel (Abb. 5.6.1 E).

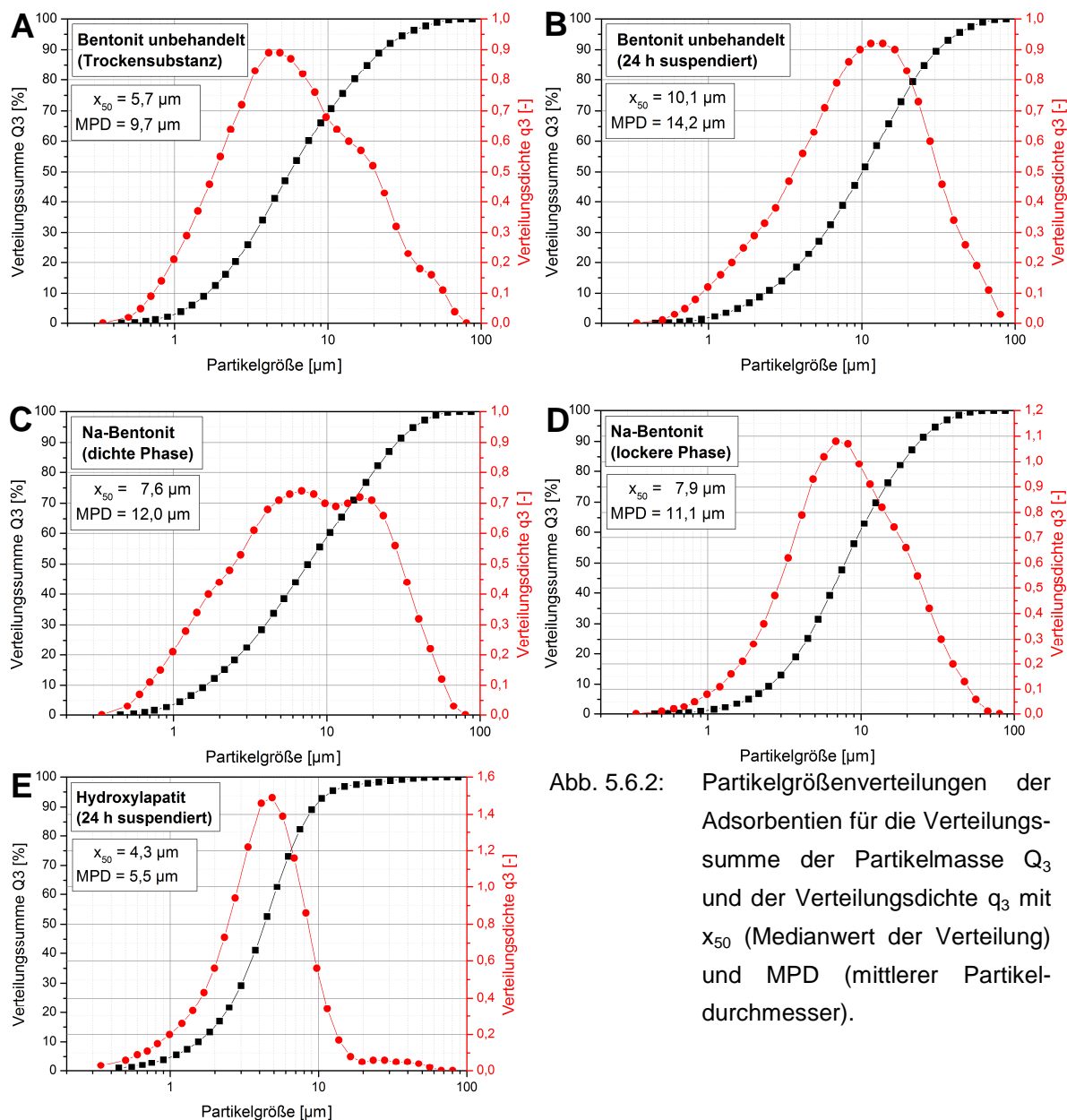


Abb. 5.6.2: Partikelgrößenverteilungen der Adsorbentien für die Verteilungssumme der Partikelmasse Q_3 und der Verteilungsdichte q_3 mit x_{50} (Medianwert der Verteilung) und MPD (mittlerer Partikeldurchmesser).

Die Partikelgrößenverteilung zeigt für die Bentonitpartikel eine breite Streuung von 2 bis 100 μm Durchmesser (Abb. 5.6.2). Durch die Quellung des Bentonits steigt der mittlere Partikeldurchmesser von 9,7 auf 14,2 μm . Es findet eine Auflösung der Schichtsilikate statt, so dass eine einheitlichere Partikeldichte verteilt resultiert. Hydroxylapatit weist eine enge Partikelgrößenverteilung auf, welche sich mit 5,5 μm mittlerem Partikeldurchmesser stark an dem Medianwert x_{50} nähert.

Des Weiteren wird die spezifische Oberfläche der Adsorbentien mittels der N_2 -Adsorptionsisothermen aus der BET-Messung betrachtet (Tab. 5.6.1).

Tab. 5.6.1: Spezifische Oberfläche verwendeter Trägermaterialien durch N_2 -Adsorption mittels BET-Messverfahren.

Element	Bentonit (trocken)	Bentonit (24 h susp.)	Na-Bentonit (dichte Phase)	Na-Bentonit (lockere Phase)	Hydroxylapatit (24 h susp.)
Oberfläche [m^2/g]	$77,5 \pm 0,28$	$41,2 \pm 0,36$	$44,0 \pm 0,12$	$23,4 \pm 0,64$	$65,0 \pm 0,17$

Das Dispergieren verändert sowohl die Morphologie als auch die spezifische Oberfläche des Bentonits. Dixon (2000) zeigt für ein hochporöses Bentonit mit 800 m^2/g , dass im wässrigen System etwa 600 m^2/g zugänglich sind.

Das Bentonit-Rohmaterial weist mit 77,5 m^2/g etwa doppelt so viel spezifische Oberfläche als die bereits dispergierten Bentonite auf. Dies kann auf kleinere Teilchen im Rohmaterial hindeuten, welche durch die Wasch- und Dispergiervorgänge ausgespült werden. Das Rohmaterial ist durch die Schichtung deutlich poröser, was die Ausbildung von Multilayerschichten bei der N_2 -Adsorption begünstigt. Durch das Dispergieren wird zudem Fe^{3+} und Ca^{2+} gegen K^+ aus dem Phosphatpuffer ausgetauscht, was nach der Lyophilisation kleinere Schichtabstände bewirkt.

Die galertartige Phase besteht vorrangig aus stark gequollenen Partikeln der Größe 2 - 10 μm . Diese Partikelgröße reichert sich in der Phase besonders stark an und bewirkt eine deutlich engere Partikelverteilung um den mittleren Partikeldurchmesser von 11,1 μm .

Die Konditionierung senkt den mittleren Partikeldurchmesser bei der dichten Phase des Na-Bentonits um 15 %. Nowikow (1995) stellt bei dem verwendeten Verfahren eine Reduktion von 4 μm auf 2 μm für die mittlere Korngröße bei einer Einengung der Korngrößenverteilung von 49 % auf 66 % Mengenanteil fest. Durch die Na^+ -Einlagerung werden kleinere Schichtabstände und ein homogeneres Material erhalten. Die kleineren Schichtabstände können eine erschwerte Zugänglichkeit für N_2 bewirken. Die tonige Phase des konditionierten Na-Bentonits hat mit 44 m^2/g eine vergleichbar große Oberfläche wie das dispergierte Bentonit. Die Konditionierung bewirkt nach Nowikow (1995) eine Oberflächenverringerung um etwa 75 %, was sich für das verwendete Na-Bentonit nicht ergibt.

Die Zugänglichkeit zu den inneren Adsorptionsflächen wird durch die Molekülgröße des Enzyms bestimmt. Der Interlayerabstand des Bentonits ist mit 0,9 - 6 nm für die recFTF kaum zugänglich, so dass der Anteil an Meso- und Makroporen (10 - 100 nm) über die Adsorptionskapazität des Bentonits entscheiden. Den größten Volumenanteil mit 90 % beinhalten dabei nach Holzer *et al.* (2010) Poren zwischen 10 - 50 nm. Die Porengröße ist multimodal und weitestgehend unabhängig von der Partikelgröße (Jovanović und Janačković, 1991). Durch die Konditionierung werden besonders diese Poren stark verengt und damit auch die Zugänglichkeit der recFTF verringert.

Hydroxylapatit hat mit 65 m²/g etwa ein Drittel mehr spezifische Oberfläche als das verwendete Bentonit. Bronshteyn und Steinberg (2002) geben 50 m²/g und eine wenig poröse Oberfläche für diesen Träger an. Hydroxylapatit weist mit einem Porenanteil von 2,9 %, einer durchschnittlichen Porengröße von 3 nm und einem Volumenanteil von 95 % für Poren < 10 nm (Yao *et al.*, 2003) deutlich weniger zugängliche Adsorptionsfläche auf als Bentonit.

Die Trägermaterialien werden in Tab. 5.6.2 hinsichtlich der Kristallstruktur und den darin enthaltenen Ionen untersucht. Diese Analyse gibt weitere Aufschlüsse zur aktivierenden bzw. stabilisierenden Wirkung von Ionen auf die Fructosyltransferase. In der Literatur werden diese Effekte meist durch elektrostatische Wechselwirkungen zu Kationen beschrieben (vgl. Kapitel 5.6.6).

Tab. 5.6.2: Elementverteilung der Trägermaterialien durch energiedispersive Röntgenspektroskopie am Rasterelektronenmikroskop.

Element	Bentonit (trocken)	Bentonit (24 h susp.)	Na-Bentonit (dichte Phase)	Na-Bentonit (lockere Phase)	Hydroxylapatit (24 h susp.)
Si [%]	23,9 ± 0,34	23,7 ± 0,48	24,5 ± 0,81	8,8 ± 0,79	-
Al [%]	9,7 ± 0,52	8,93 ± 0,39	9,9 ± 0,02	3,2 ± 0,32	-
O [%]	57,9 ± 0,48	60,0 ± 0,23	57,1 ± 0,76	22,3 ± 2,24	55,9 ± 2,64
Na [%]	1,9 ± 0,01	0,8 ± 0,02	3,3 ± 0,05	33,7 ± 2,28	-
K [%]	1,0 ± 0,00	1,9 ± 0,05	0,9 ± 0,04	0,3 ± 0,04	-
Mg [%]	2,1 ± 0,19	2,0 ± 0,14	2,0 ± 0,01	1,0 ± 0,31	-
Cl [%]	-	-	0,5 ± 0,04	29,8 ± 0,98	-
Fe [%]	2,2 ± 0,04	1,7 ± 0,04	1,9 ± 0,07	1,1 ± 0,29	-
Ca [%]	1,5 ± 0,20	1,1 ± 0,20	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,04	18,2 ± 1,58
P [%]	-	-	-	-	26,0 ± 1,10

Die Summenformeln von Montmorillonit und Hydroxylapatit ergeben folgende molekulare Zusammensetzung:

- Montmorillonit (Si 21,9 %, Al 8,8 %, O 65,7 %, Na 1,8 %, Mg 1,8 %)
- Hydroxylapatit (O 61,9 %, Ca 23,8 %, P 14,3 %)

Das verwendete Bentonit spiegelt im Wesentlichen die Zusammensetzung von Montmorillonit wider, welches als Hauptbestandteil mit bis zu 90 % enthalten sein kann. Außerdem sind Calcium, Kalium, und Eisen sowie organische Bestandteile enthalten.

Das Austauschverhalten während der Enzymadsorption wird durch eine Vorinkubation für 24 h in Phosphatpuffer berücksichtigt. Dabei wird bei Bentonit vorrangig ein Austausch der Na-Ionen durch Kalium bewirkt. Zudem wird Calcium und Eisen herausgelöst.

Durch die Na-Konditionierung sinkt der Calciumanteil von 1,1 auf 0,1 %, wohingegen der Natriumanteil von 0,8 auf 3,3 % ansteigt. Eisen und Magnesium sind stark in die Montmorillonitstruktur integriert, da sich dieser Anteil durch die Konditionierung kaum ändert. Die galertartige Phase besteht trotz mehrmaliger Spülvorgänge hauptsächlich aus dem NaCl der Konditionierung. Nach Abzug des NaCl-Anteils zeigt sich die gleiche Zusammensetzung an Si, Al, O wie die tonige Phase, so dass etwa ein Drittel des kristallinen Montmorillonits enthalten ist.

Der Phosphoranteil des verwendeten Hydroxylapatits ist etwa 3,5-fach als bei der allgemeinen Summenformel, was durch die Anlagerung von Phosphationen des Puffers hervorgerufen wird.

In inerter N₂-Atmosphäre zeigt die thermogravimetrische Analyse die enthaltene Restfeuchte, das Wasser aus den Zwischenschichten, das adsorbierte und mit Ionen assoziierte Wasser und das Konstitutionswasser durch Substitution der Hydroxylgruppen an (Abb. 5.6.3). Im Vergleich zur Messung mit Stickstoff können in Gegenwart von Sauerstoff die Gewichtsanteile oxidierbarer, organischer Substanzen detektiert werden.

Das unbehandelte Bentonit (Rohmaterial) zeigt nach der Gefriertrocknung einen Masseverlust von etwa 8 % auf. Das lyophilisierte Na-Bentonit hält das Wasser durch den höheren Salzanteil deutlich stärker fest und weist daher eine um 4 % höhere Restfeuchte auf. Die Restfeuchte entweicht bis etwa 100 °C aus dem Material. Im Bereich 100 bis 400 °C und Gegenwart von Sauerstoff resultiert gegenüber der N₂-Atmosphäre ein Masseverlust von etwa 1,3 % für das Rohmaterial und 0,9 % für Na-Bentonit. Eine CO₂-Freisetzung aus den organischen Bestandteilen ist dabei nicht eindeutig zuzuordnen. In Korrelation zur Elementaranalyse (Tab. 5.6.3) beträgt der Masseanteil organischer Substanzen nur 1 - 2 % kann ein Einfluss von organischen Substanzen auf die Adsorption für Bentonit ausgeschlossen werden.

Zwischen 400 und 750 °C wird für beide Proben ein Masseverlust von 4,5 - 5,0 % festgestellt. Die Masseverluste bei der thermogravimetrischen Analyse können nach Mielenz *et al.* (1953) und Earley *et al.* (1953) im Bereich 100 - 400 °C auf adsorbiertes und aus den Zwischenschichten stammendes Wasser und im Bereich 400 - 750 °C dem Verlust von Hydroxylgruppen zugeordnet werden. Nach Weickmann (2005) erfolgt die Dehydratation von Aluminiumoxidhydroxiden $[\text{AlO}(\text{OH})]$ über Aluminiumtrihydroxid $[\text{Al}(\text{OH})_3]$ zu Aluminiumoxid $[\text{Al}_2\text{O}_3]$. Beide Proben verhalten sich sowohl mit Stickstoff als auch mit Sauerstoff beim Kurvenverlauf annähernd gleich.

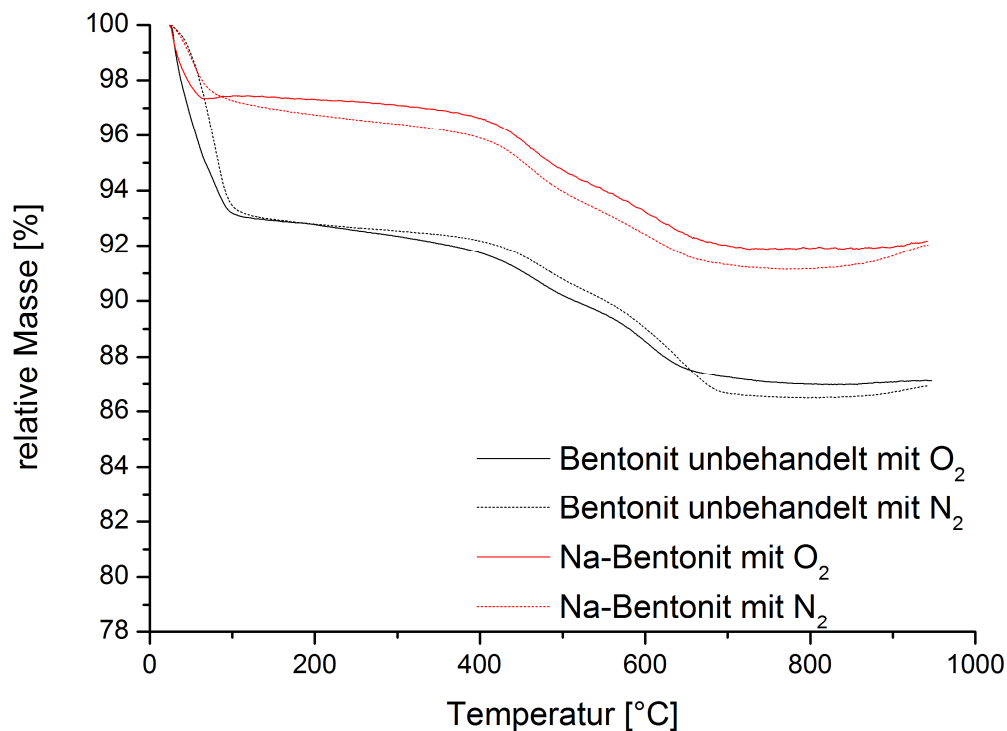


Abb. 5.6.3: Thermogravimetrische Analyse des unbehandelten Bentonits (Rohmaterial) und des lyophilisierten, konditionierten Na-Bentonits in oxidierender bzw. inerter Atmosphäre.

Tab. 5.6.3: Elementaranalyse des unbehandelten Bentonitrohmaterials

C [%]	H [%]	N [%]
1,01 ± 0,12	1,27 ± 0,01	0,4 ± 0,04

5.6.2 Adsorptive Bindung an Bentonit und Hydroxylapatit

Die Adsorption von Enzymen beinhaltet den Vorteil, dass sich aufgrund der schwachen Bindungskräfte nur ein geringer negativer Einfluss auf die Konformation und die Aktivität des Enzyms ergibt.

Immobilisierungen bakterieller Fructosyltransferasen durch reine Adsorption werden bisher für Hydroxylapatit (Chambert und Petit-Glatron, 1993; Steinberg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2000; Bronshteyn und Steinberg, 2002; Rozen *et al.*, 2003), keramisches Material SM-10

(Ilzuka *et al.*, 1993), Chitopearl BCW2501 (Lim *et al.*, 2001), Chitin und Trisopor mit quartären Aminogruppen (Kono *et al.*, 1994; Baciú *et al.*, 2005), Tonmineral Bentonit (Zwerenz, 2012) sowie an Tonerde, Silikat, Polyvinylalkohol und Chitosan (Esawy *et al.*, 2008) beschrieben. Auch die Anbindung über einen Affinitätstag zu Chitin (Chiang *et al.*, 2009) sowie Wechselwirkungen zu den Ionenaustauschern Sepabeads FP-DA (Vanková *et al.*, 2007), DEAE-Cellulose, Sephadex, Dowex (Esawy *et al.*, 2008; Rathbone *et al.*, 1986) ist dokumentiert.

Aus der Proteinadsorption mit unbehandeltem Bentonit, konditioniertem Na-Bentonit und Hydroxylapatit ergeben sich Adsorptionsisothermen des Langmuir-Typs (Abb. 5.6.4).

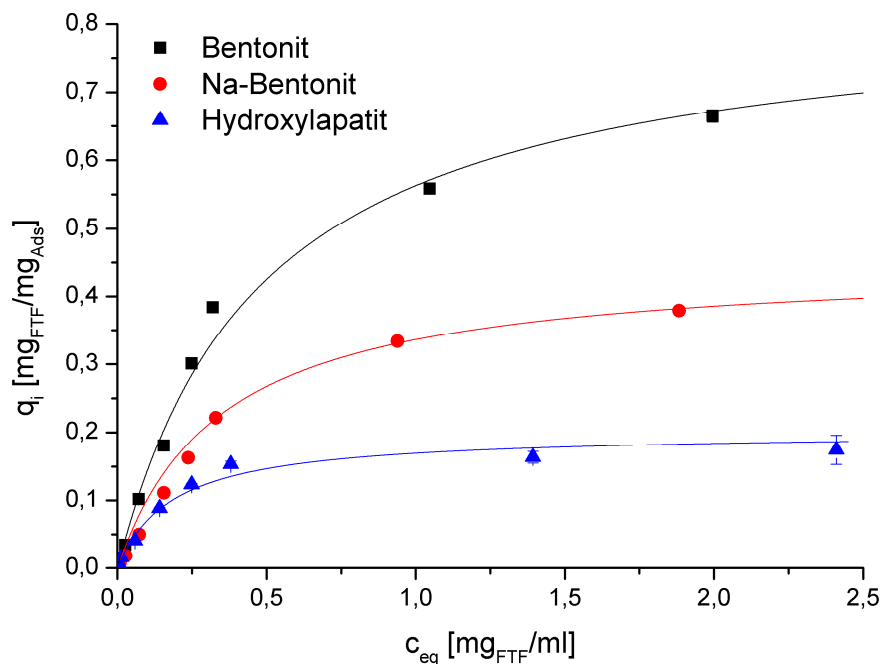


Abb. 5.6.4: Adsorptionsisothermen der recFTF_{Strep} für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.

Aus den Adsorptionsisothermen wird die maximale Beladung q_{max} und der Sorptionskoeffizient K_L für die unterschiedlichen Träger bestimmt (Tab. 5.6.4).

Tab. 5.6.4: Kennwerte der Adsorptionsisothermen nach Langmuir.

Trägermatrix	Bentonit	Na-Bentonit	Hydroxylapatit
q_{max} [mg _{FTF} /mg _{Ads}]	0,834 ± 0,062	0,452 ± 0,015	0,201 ± 0,025
K_L [-]	2,080 ± 0,276	2,894 ± 0,205	5,397 ± 1,169
Regression [-]	0,991	0,990	0,977

Unbehandeltes Bentonit zeigt mit 0,834 mg_{FTF}/mg_{Ads} die höchste maximale Proteinbeladung und damit etwa zweimal mehr adsorbiertes Protein als konditioniertes Na-Bentonit bzw. viermal mehr als Hydroxylapatit. Im Gegensatz dazu ist der Sorptionskoeffizient für Na-Bentonit 1,4-fach und für Hydroxylapatit 2,6-fach höher als für Bentonit.

Die Konditionierung bewirkt durch die Verringerung der Interlayerabstände eine Verkleinerung der Porenstruktur, die der recFTF einem großen Teil der Adsorptionsfläche entzieht.

Die Adsorption an Hydroxylapatit zeigt mit $0,2 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ die geringste Beladungskapazität unter den verwendeten Trägern. Da die Wechselwirkungen bei diesem Material durch den pH-Wert, die Ionenstärke und die Ionenkonzentration des umgebenden Mediums geprägt werden, kann die Adsorptionsausbeute durch eine Anpassung des Puffersystems gegebenenfalls gesteigert werden. Die maximale Beladung von Hydroxylapatit wird insbesondere durch die Anwesenheit von Phosphationen beeinflusst, die auch bei der recFTF im Puffer vorliegen. Nach Hughes Wassell *et al.* (1995) halbiert schon die Anwesenheit von $5 \text{ mM } (\text{PO}_4)^{2-}$ -Ionen die maximale Beladung mit BSA.

Aus dem Träger-Enzym-Verhältnis resultiert ein Sorptionsgleichgewicht zwischen gelöstem Enzym im Überstand und adsorbiertem Enzym am Träger. Wird der Verlauf der Ausbeute an adsorbiertem Enzym in Bezug zum eingesetzten Verhältnis betrachtet (Abb. 5.6.5), zeigt sich bei Hydroxylapatit eine annähernd lineare Abnahme mit steigender Enzymkonzentration. Dies kann zum einen auf eine Absättigung der spezifischen Oberfläche und zum anderen auf eine Teiladsorption von inaktiven Proteinanteilen zurückzuführen sein.

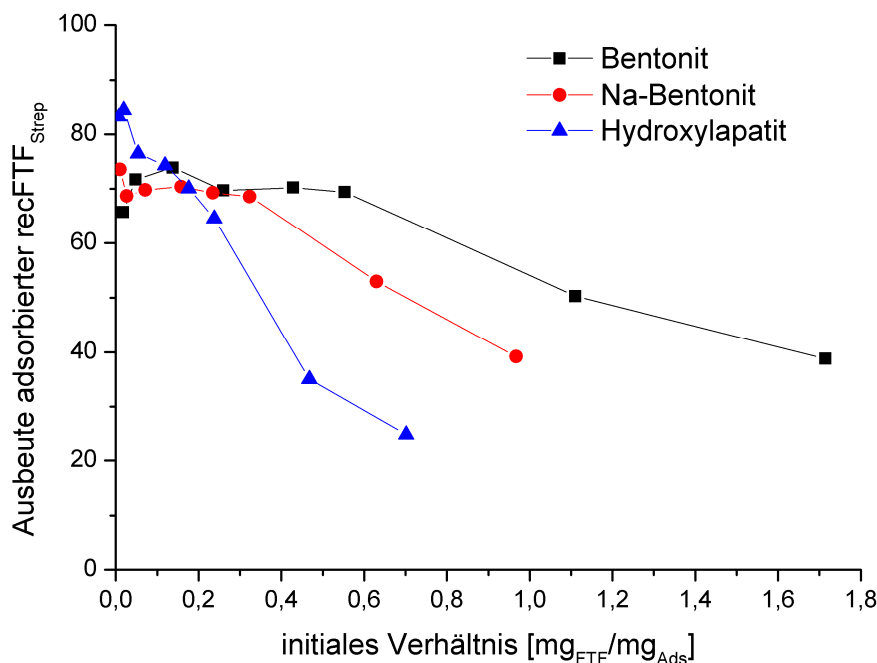


Abb. 5.6.5: Ausbeute an adsorbierter recFTF_{Strep} für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit in Bezug zu den eingesetzten Massenkonzentrationsverhältnissen (recFTF_{Strep}:Adsorbens).

Besonders auffallend ist, dass sich für Bentonit und Na-Bentonit bis zu einem bestimmten Enzym-Träger-Verhältnis eine sehr konstante Adsorption von 70 % ergibt. Die maximal möglichen Enzym-Träger-Verhältnisse beziehen sich beide auf $1,1 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{ml}$ mit jeweils $0,75 \text{ mg}_{\text{FTFads}}/\text{ml}$ immobilisierte recFTF. Die Überstände dieser Fraktionen weisen keine Aktivität auf, so dass besonders die korrekt gefaltete und aktive recFTF_{Strep} spezifisch an Bentonit bzw. Na-Bentonit adsorbiert wird. Auch Zwerenz (2012) stellt bei Bentonit für eine

FTF aus *B. megaterium* sehr selektive Adsorption fest. Die Aminosäuresequenz der FTF aus *B. subtilis* weist gegenüber der von Zwerenz verwendeten SacB aus *B. megaterium* jedoch nur 74% Identität auf (Homann *et al.*, 2007; Biedendieck, 2007). Daher muss sich die Affinität aus einer konservierten Domäne auf der Proteinoberfläche ergeben.

Der Anteil an inaktiver FTF verhält sich gegenüber der Verdünnung bzw. der Aufkonzentrierung sehr konstant, was aus dem linearen Verhalten der Aktivität zur Proteinkonzentration (Anhang, Abb. 10.8.1) sowie im Vergleich unterschiedlicher renaturierter IB-Chargen (Abb. 5.4.10 B) ersichtlich ist. Durch die selektive Adsorption von aktiver recFTF an Bentonit kann der Anteil des inaktiven Enzyms bestimmt werden. Die Güte der Rückfaltung entscheidet über den Anteil des inaktiven Enzyms. Oberhalb der maximalen Enzym-Träger-Verhältnisse zeigt sich eine recFTF-Absättigung des Trägers, was auch an der zunehmenden Aktivität im Überstand festgestellt wird.

Die Aktivitätsadsorptionsisothermen korrelieren mit der Proteinkonzentration (Abb. 5.6.6).

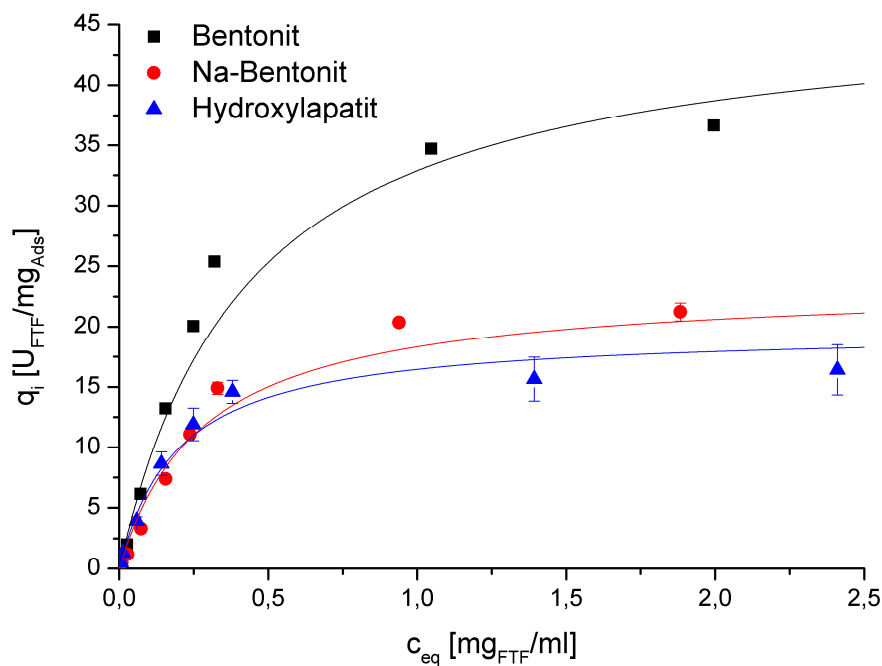


Abb. 5.6.6: Aktivitätsadsorptionsisotherme der recFTF_{Strep} für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.

Die Kennwerte der Aktivitätsadsorptionsisothermen sind in Tab. 5.6.5 dargestellt.

Tab. 5.6.5: Kennwerte der Aktivitätsadsorptionsisothermen nach Langmuir.

Trägermatrix	Bentonit	Na-Bentonit	Hydroxylapatit
q_{\max} [U _{FTF} /mg _{Ads}]	47,04 ± 4,80	23,55 ± 1,72	19,72 ± 1,78
K_L [-]	2,32 ± 0,44	3,52 ± 0,52	5,05 ± 0,77
Regression [-]	0,975	0,982	0,979

Die Aktivitäten der adsorbierten recFTF weisen im Zeitraum von bis zu drei Stunden eine konstant lineare Glucosebildung auf, was für $t > 0,5$ min einen reproduzierbaren Vergleich untereinander ermöglicht (vgl. Kapitel 5.5.3).

Bentonit zeigt eine maximale Beladungsaktivität von $47,04 \text{ U}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ und damit analog zur Proteinbeladung doppelt so viel Aktivität als das Na-Bentonit. Das Na-Bentonit zeigt in Bezug auf die eingesetzte Trägermasse eine deutlich höhere Trägerbeladung mit aktivem Enzym. Der Na-Austausch der Zwischenschichtionen scheint durch die Reduzierung der Adsorptionsfläche die Bindestellen der recFTF zu komprimieren.

Während jedoch die maximale Proteinbeladung für Hydroxylapatit gegenüber Na-Bentonit 50% beträgt, sind in diesem Anteil nur 16,3 % weniger Aktivität enthalten. Die an Hydroxylapatit adsorbierte recFTF ist bezogen auf die Proteinbeladung deutlich aktiver. Die Sorptionskoeffizienten entsprechen etwa den Werten aus der Proteinadsorption.

Nach Wu und Narsimhan (2008 a) sowie Fenoglio *et al.* (2011) kann ein negativer Einfluss auf die Aktivitätsbeladung aufgrund hoher Oberflächenkonzentration resultieren. Dieser kann für die recFTF_{Strep} weitgehend ausgeschlossen werden, da die Adsorption der recFTF_{Strep} unabhängig von den eingesetzten Träger:Protein-Verhältnissen verläuft und ein Sättigungsverhalten nach Langmuir aufweist.

Die Aktivität von freier und adsorbierter recFTF_{Strep} steht in linearer Abhängigkeit zur Enzymkonzentration (Abb. 5.6.7). Die Vergleichbarkeit zum freien Enzym wird um den Anteil von 30% inaktivem Protein korrigiert (vgl. Abb. 5.6.5). Die adsorbierte recFTF weist trotz dieser Korrektur für alle Träger eine deutlich höhere spezifische Aktivität auf als für das freie Enzym.

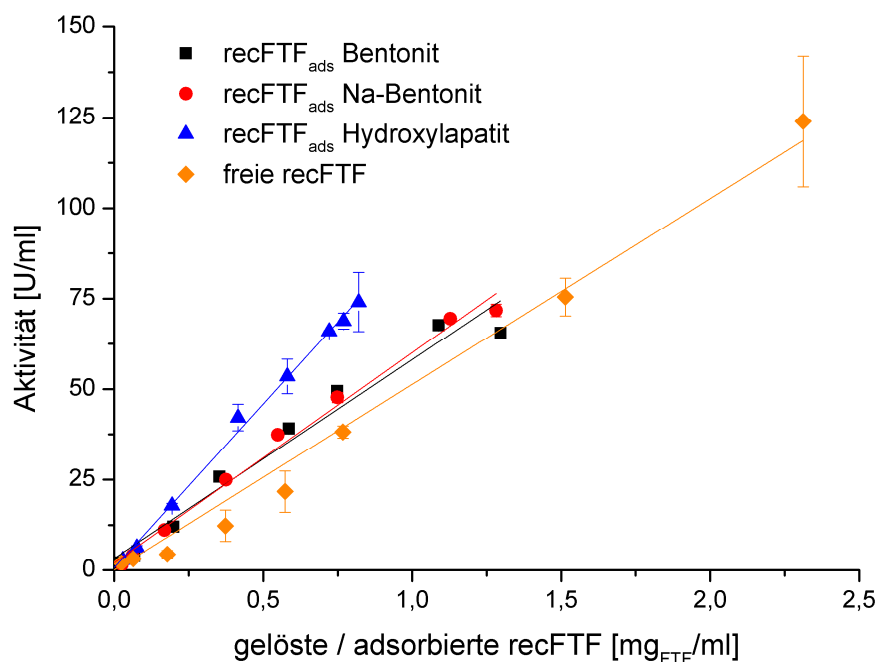


Abb. 5.6.7: Aktivität der freien bzw. adsorbierten Proteinmenge für verschiedene Immobilisate. Für die freie recFTF wird ein Anteil von 30% inaktivem Protein berücksichtigt (vgl. Abb. 5.6.5).

Die erhöhte spezifische Aktivität nach der Immobilisierung lässt auf eine Aktivierung durch das Trägermaterial schließen. Die Adsorption an Hydroxylapatit zeigt einen stärker aktivierenden Einfluss als die Bentonite.

Die hohe Adsorptionsaffinität bei Hydroxylapatit sowie die hohen spezifischen Aktivitäten der gebundenen recFTF kompensieren die geringe Menge des adsorbierten Enzyms weitgehend. Apatit und auch Silikat stehen auch in der natürlichen Umgebung von Fructosyltransferase exprimierenden Bakterienstämmen als Anheftungsfläche zur Verfügung. Daher ist anzunehmen, dass eine FTF-Anheftung an kristalline Oberflächen zudem durch eine spezifische Bindungsdomäne vermittelt wird. Bezzate *et al.* (2000) stellen eine SacB-vermittelte Bodenaggregation in Silikat/Tonerdegemisch fest. Vacca Smith und Bowen (2000) dokumentieren mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen die mikrobielle Besiedlung von Hydroxylapatit, welches durch die Anheftung von FTFs, GTFs sowie polymeren Saccharidstrukturen vermittelt wird. Zudem stellen Steinberg *et al.* (2002) durch die FTF-Immobilisierung an Hydroxylapatit einen deutlich stabilisierenden Effekt gegenüber denaturierenden Anti-Plaque-Agentien fest.

Da der aktive Anteil durch mehr Trägeroberfläche nicht steigt, kann eine selbstinduzierte Rückfaltung in Gegenwart der Trägermaterialien ausgeschlossen werden. Die Absättigung von 1,95 g/l Bentonit bzw. 3,38 g/l Na-Bentonit erfolgt ab etwa 1,1 g_{FTF}/l mit 67 % bzw. 74 % der maximalen Beladungskapazität ohne Aktivitätseinbußen (vgl. Abb. 5.6.5). Die Aktivitätsausbeuten bei höheren Proteinkonzentrationen werden durch das Agglomerationsverhalten der recFTF beeinflusst und zeigen eine geringere spezifische Aktivität.

Die Verringerung der spezifischen Aktivität bei hochkonzentrierten FTF-Lösungen kann bei Bentonit auf folgende Erscheinungen zurückgeführt werden:

- Ansätze einer Multilayeradsorption
- Konzentrationsbedingte Destabilisierung, bei der es zu einer Freilegung apolarer Aminosäurebereiche kommt, welche die Ausbildung unspezifischer van-der-Waals Wechselwirkungen ermöglichen.
- konzentrationsabhängige Co-Immobilisierung inaktiver Bestandteile.

Bei einer Co-Immobilisierung mit 50 - 75 % (w/w) BSA-Zusatz wird trotz der Teiladsorption des Albumins die gesamte recFTF-Aktivität im Immobilisat gebunden.

Bei den Immobilisaten fällt im Vergleich zum freien Enzym die sprunghafte Verringerung der Saccharosekonzentration sehr unterschiedlich aus (Abb. 5.6.8). Das freie Enzym setzt im Zeitraum (0 - 0,5 min) 13,9 % der Saccharose um, wohingegen der Umsatz des Immobilisat mit Hydroxylapatit 6,1 %, mit Na-Bentonit 8,6 % und mit Bentonit 0,8 % beträgt. Im weiteren Reaktionsverlauf sind die Substratumsätze für die Immobilisate höher als für das freie Enzym (vgl. Abb. 5.6.7).

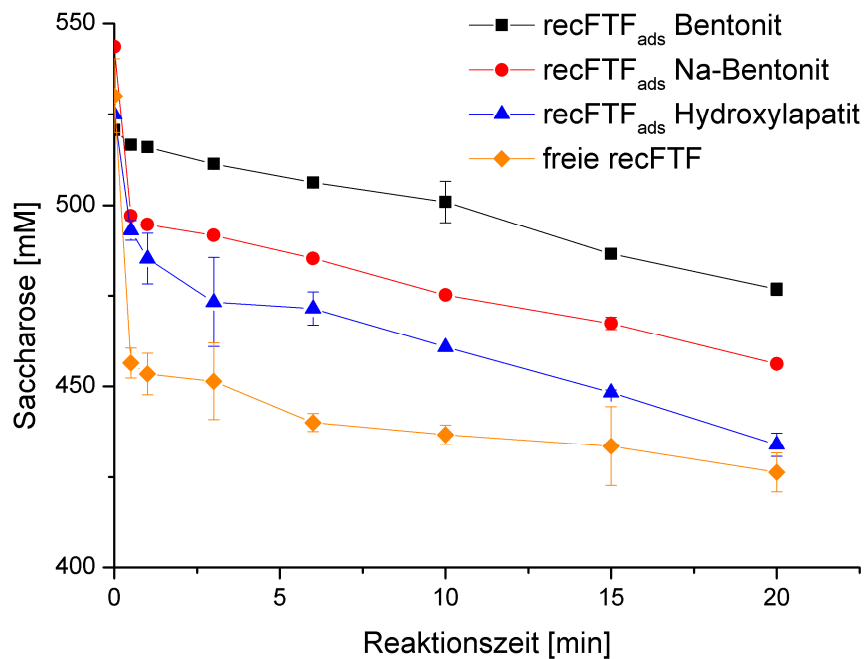


Abb. 5.6.8: Substratumsätze von freier, aktiver recFTF_{Strep} (0,573 mg_{FTF}/ml) und adsorbierter recFTF_{Strep} an Bentonit (0,59 mg_{FTFads}/ml), Na-Bentonit (0,55 mg_{FTFads}/ml) und Hydroxylapatit (0,58 mg_{FTFads}/ml).

Durch die Immobilisierung der recFTF ändert sich die Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität des Enzyms (Tab. 5.6.6).

Tab. 5.6.6: Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die freie und die adsorbierte recFTF_{Strep} für $t \geq 0,5$ min. Konzentrationsabnahme an Saccharose und -zunahme an Glucose für $t = 0 - 0,5$ min.

freie und immobilisierte FTF	U_T [U/l]	U_H [U/l]	U_T/U_H [-]	$-C_{Sac\ ini}^{[1]}$ [mM]	$C_{Glu\ ini}^{[1]}$ [mM]	$C_{Glu}/C_{Sac}^{[1]}$ [-]
freie recFTF	2051	13425	0,15	73,7	35,6	0,48
recFTF _{ads} Bentonit	19585	19855	0,99	4,1	3,9	0,95
recFTF _{ads} Na-Bentonit	20448	17047	1,20	46,5	2,7	0,06
recFTF _{ads} Hydroxylapatit	37553	15653	2,40	26,6	24,5	0,92

^[1] für t bis 0,5 min

Für das freie Enzym wird deutlich mehr Hydrolyse als Transfructosylierung festgestellt. Die an Bentonit und Na-Bentonit adsorbierte recFTF zeigt neben der höheren Aktivität ein etwa gleichwertiges Verhältnis aus Transfructosylierungs- zu Hydrolyseaktivität. Die Transfargeschwindigkeit für die Bentonitimobilisate steigt im Vergleich zum freien Enzym um das 10-fache und bei Hydroxylapatit sogar 18-fache. Bei Chambert und Petit-Glatron (1993) bewirkt die Adsorption an Hydroxylapatit eine 2-fache Reaktionsbeschleunigung.

Die Immobilisierung ändert nicht nur die Aktivität zu höheren Umsatzraten sondern zeigt bei der Bilanzierung auch eine deutliche **Verlagerung des Reaktionsgleichgewichtes auf die**

Transfructosylierung. Hydroxylapatit zeigt mit konstanten 71,5 % im Vergleich zu den Bentoniten mit etwa 50 % einen signifikant höheren Transfructosylierungsanteil. Bei den Bentoniten steigt die Transferrate im Reaktionsverlauf sogar mit + 0,2 %/min leicht an. Dies kann auf eine bindungsinduzierte, begünstigende Konformation zur Transfructosylierung hinweisen. Zwerenz (2012) erhält bei der Modellierung kinetischer Umsätze für eine an Na-Bentonit adsorbierte SacB aus *B. megaterium* Hinweise auf eine solche Gleichgewichtsverlagerung. Dabei wird im Vergleich zum freien Enzym eine 40 %-ige Senkung der Hydrolyseaktivität bei 2,3- bzw. 2,7-facher Beschleunigung der Polymerisierungs- bzw. Akzeptorreaktion festgestellt. Die Reaktion der Fructosyltransferase kann insbesondere durch die Trägerstruktur und den darin enthaltenen Ionen beeinflusst werden (vgl. Kapitel 5.6.5). Ein Anhaltspunkt dafür zeigt Szwengiel *et al.* (2007) für eine Fructosyltransferase aus *B. subtilis* auf, wo durch die Zugabe von Mn^{2+} eine Verdopplung der Enzymaktivität sowie eine Reduktion der Hydrolyseaktivität um 80 % erzielt wird. Dort steigt der Quotient aus v_{max} für Transfructosylierung und Hydrolyse von 0,8 für das freie auf 3,3 für das immobilisierte Enzym. Bei der recFTF steigt das U_T/U_H -Verhältnis von 0,15 für das freie Enzym auf 2,4 für das Hydroxylapatitadsorbat. Wie sich die Gleichgewichtsverlagerung der Transfructosylierung in Gegenwart eines weiteren Pyranosylakzeptors auf die Produktbildung auswirkt, muss noch gezeigt werden, da in der Saccharosereaktion vorwiegend Levan gebildet wird. Dahingehend spielt im Reaktionsgefüge auch die immobilisierte Enzymkonzentration eine wesentliche Rolle.

Die **initiale Freisetzung der Glucose** wird durch die Immobilisierung bzw. Aktivierung trägerspezifisch verändert und beeinflusst das Reaktionsgleichgewicht nachhaltig. Zudem muss bei hohen Konzentrationen an recFTF auch die Burst-Phase berücksichtigt werden:

- Eine hohe Glucosefreisetzung bewirkt beim freien Enzym eine deutlich höhere Hydrolyse.
- Bei einer geringen Glucosefreisetzung ist diese vorwiegend in den Pyranosylköpfen der Polyfructoside gebunden.

Die Unterschiede im Reaktionsverlauf können zudem durch **Wechselwirkungen der Saccharide mit dem Trägermaterial** beeinflusst werden. Die Pyranose- bzw. Furanoseringe werden beispielsweise nach Greenland (1956) durch van-der-Waals Kräfte über interlamellare Adsorption an Montmorillonit gebunden. Die hohe Differenz zwischen Bentonit und Na-Bentonit kann auf eine besonders hohe Glucoseadsorption hindeuten. Ungeladene Polysaccharide mit hohem Molekulargewicht adsorbieren zudem verstärkt an Montmorillonit (Parfitt und Greenland, 1970).

Die Adsorption von Polysacchariden an mineralische Oberflächen ist besonders abhängig vom sauren bzw. basischen Charakter des Trägers. Das verwendete Bentonit zeigt im wässrigen Milieu mit einem pH von 7,7 - 8 ein leicht basisches Verhalten. Der pH-Wert des Puffers im leicht sauren Bereich begünstigt die Adsorption durch den hohen isoelektrischen Punkt des basischen Trägers. Besonders der Gehalt an hydroxylierten Metallen ist für die

Adsorption durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und die Komplexbildung zu den Polysacchariden entscheidend (Liu *et al.*, 2000). Weissenborn *et al.* (1995) postuliert für eisenhaltige Materialien starke Wechselwirkungen zu den Hydroxylgruppen von den Monomeren aus Stärke. Hydroxide mit hohem Calciumgehalt zeigen eine hohe Adsorption gegenüber Polysacchariden (De Araujo, 1988; Raju *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000). Die Affinität der Saccharide zu Calcium kann damit auch zur lokalen Konzentrationserhöhung der Produkte am Hydroxylapatit bzw. Alginat beitragen.

Um das Rückhaltevermögen von Bentonit oder Hydroxylapatit in einem technischen Prozess zu verbessern, kann das Adsorbat zudem in einer Hydrogelmatrix eingeschlossen werden. Zur Erhöhung der volumetrischen Aktivität kann alternativ auch eine Trocknung der Alginatperlen in Betracht gezogen werden. Die Alginattrocknung ermöglicht mit einer Fructosyltransferase aus *Aspergillus aculeatus* die kontinuierliche FOS-Produktion über 30 Tage im Festbettreaktor (Fernandez-Arrojo *et al.*, 2013). Durch diese Methode wird das Enzym an der Oberfläche angereichert, das Schwellverhalten in Saccharoselösung unterdrückt, die volumetrische Aktivität um das 30-fache und die Raum-Zeit-Ausbeute um das 40-fache erhöht.

5.6.3 Kovalente Bindung an Eupergit C

Die kovalente Verknüpfung der recFTF-Aminogruppen an die Oxirangruppen des Eupergit C zeigt im Vergleich zu den Adsorbentien sehr geringe Protein- und Aktivitätsbeladungen. Der mittlere Porendurchmesser von 100 nm ist für die recFTF gut zugänglich und die spezifische Oberfläche von 53 m²/g entspricht etwa der von Hydroxylapatit.

Bei einem Träger:Enzym-Massenverhältnis von 3,3:1 erfolgt zunehmend eine Sättigung von Eupergit C. Dadurch können Protein- und Aktivitätsbindungsisothermen nach Langmuir berechnet werden (Tab. 5.6.7).

Tab. 5.6.7: Kennwerte der Protein- und Aktivitätsadsorptionsisothermen nach Langmuir.

Eupergit C	Protein- bindungsisotherme	Aktivitäts- bindungsisotherme
q_{\max} [mg _{FTF} /mg _{Ads}], [U _{FTF} /mg _{Ads}]	0,028 ± 0,022	1,33 ± 0,04
K_L [-]	0,166 ± 0,177	0,95 ± 0,07
Regression [-]	0,900	0,996

Es werden maximale Aktivitätsausbeuten von 16,6 % bei einer spezifischen Enzymaktivität von 47,5 U_{FTF}/mg_{FTF,ads} erzielt. Ein negativer Einfluss der kovalenten Bindung auf die aktive Konformation kann daher weitgehend ausgeschlossen werden. Es werden maximal 986 U_{FTF}/g_{Träger} gebunden. Baciú *et al.* (2005) zeigt für Eupergit C eine Bindung von 2,8 U_{FTF}/g_{Träger}. Für eine rekombinant produzierte FTF stellen Ortiz-Soto *et al.* (2009) eine

maximale Aktivität von $640 \text{ U}_{\text{FTF}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ fest. Für den technischen Einsatz zeigt Eupergit C im Vergleich zu den anderen Trägern eine zu geringere Proteinbeladung und Bindungsaffinität.

5.6.4 Matrixeinschluss in Alginat

Die Immobilisierung in einer Hydrogelmatrix aus 3%-igem Ca-Alginat erfolgt bei gleichzeitiger Quervernetzung durch Glutaraldehyd. Das Alginatimmobilisat enthält $0,452 \text{ g}_{\text{FTF}}/\text{g}_{\text{Alginat}}$ mit $71 \text{ U}_{\text{FTF}}/\text{g}_{\text{Alginat}}$. Der mittlere Durchmesser der Alginatperlen beträgt 0,9 mm.

Ungeladene Moleküle, wie Saccharose bzw. die Reaktionsprodukte, können sich im Gegensatz zur eher positiv geladenen recFTF in der anionischen Netzstruktur des Calcium-Alginats gut bewegen. Der Saccharoseverbrauch zu Reaktionsbeginn fällt mit 7,3 % beim Alginatimmobilisat deutlich geringer aus als beim freien Enzym mit 16,0 % (Abb. 5.6.9). Der Wert ist mit den Adsorbaten von Hydroxylapatit und Na-Bentonit vergleichbar.

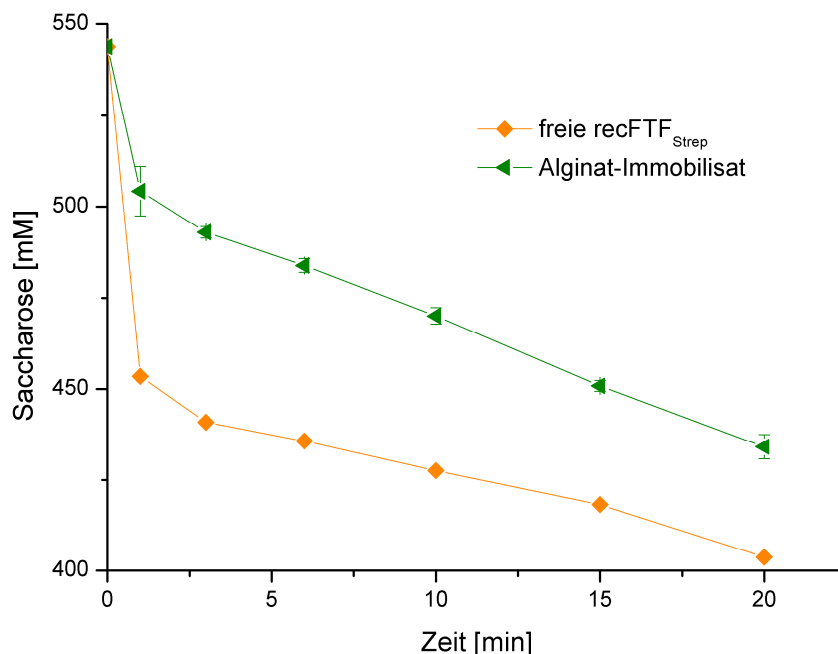


Abb. 5.6.9: Substratumsätze von freier recFTF_{Strep} ($0,45 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{ml}$) und in Alginatmatrix immobilisierter recFTF_{Strep} ($0,49 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{ml}$).

Es wird keine inaktivierende Beeinträchtigung der Reaktion durch die kovalente Quervernetzung festgestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit für $> 0,5 \text{ min}$ ist trotz gleicher Enzymkonzentration für das Alginatimmobilisat 1,5-fach höher als für das freie Enzym. Im Reaktionsverlauf wird zudem eine Steigerung der Transfargeschwindigkeit festgestellt. Die effektive Diffusion beträgt $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ ($2,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$) für $t > 0,5 \text{ min}$.

Die hohe Freisetzung von Glucose verschiebt beim freien Enzym das Reaktionsgleichgewicht auf einen Hydrolyseanteil von mehr als 50 %, woraus ein negatives $U_{\text{T}}/U_{\text{H}}$ -Verhältnis resultiert (Tab. 5.6.8). Im Vergleich der calciumhaltigen Immobilisate ist das $U_{\text{T}}/U_{\text{H}}$ -Verhältnis von Alginat um 40 % höher als das von Hydroxylapatit.

Tab. 5.6.8: Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die freie und die in Alginat immobilisierte recFTF_{Strep} für $t \geq 0,5$ min. Konzentrationsabnahme an Saccharose und Konzentrationszunahme an Glucose für $t = 0 - 0,5$ min.

freie und immobilisierte FTF	U_T [U/l]	U_H [U/l]	U_T/U_H [-]	$-C_{Sac\ ini}^{[1]}$ [mM]	$C_{Glu\ ini}^{[1]}$ [mM]	$C_{Glu}/C_{Sac}^{[1]}$ [-]
freie recFTF	- 3586	5898	- 0,6	90,1	61,7	0,68
recFTF _{imm} Alginat	57914	17172	3,37	36,6	3,6	0,10

^[1] für t bis 0,5 min

Ein geringerer Konzentrationsabfall an Saccharose sowie eine geringe Glucosefreisetzung, deutet auf Diffusionslimitierungen bzw. eine Absättigung des porösen Trägers hin. Für kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von < 20 kDa besteht nach Tanaka *et al.* (1984) im Vergleich zu Wassermolekülen keine wesentliche Diffusionslimitierung im Calcium-Alginatgel. Die fructosylierten Produkte diffundieren entsprechend ihrer Molekülgröße deutlich langsamer aus dem Träger, dabei kommt es zu einer lokalen Konzentrationserhöhung der Produkte. Der Transfructosylierungsanteil von 72 % ist adäquat zum ebenso calciumhaltigen Hydroxylapatit. Dieser steigt im Reaktionsverlauf mit $+ 0,2$ %/min an, was auf die Anreicherung der Reaktionsprodukte in der Mikroumgebung des Enzyms zurückgeführt wird. Die Konzentrationspolarisation wird durch die Trägerporosität, Diffusionslimitierungen sowie Wechselwirkungen der Fructosylierungsprodukte zum Träger und zu den Bindungsdomänen des Enzyms beeinflusst.

Der Einschluss in Alginat, Agar und Agarose (Esawy *et al.*, 2008) zeigt, auch gekoppelt an eine vorgeschaltete Adsorption (Zwerenz, 2012), Potential für die technische Anwendung. Selbst bei längerer Lagerung des Immobilisates wird kein Proteinanteil im Überstand festgestellt.

5.6.5 Einfluss von trägergebundenen Ionen auf die Adsorption und die Enzymaktivität der recFTF

Bei den verwendeten Trägermaterialien werden vorwiegend ionische Wechselwirkungen der Chemisorption ausgebildet. Bei den Bentoniten und bei Hydroxylapatit zeigt sich ein deutlich aktivierender Einfluss gegenüber dem freien Enzym. Die spezifische Adsorption und die Verlagerung des Reaktionsgleichgewichtes kann auf die Ionen in der kristallinen Struktur der Trägermaterialien zurückzuführen sein.

Bentonit enthält nach Adams (1987) vorwiegend Al^{3+} , Fe^{3+} und Cr^{3+} in der Oktaederschicht, also Ionen mit kleinem Radius und hoher Ladung. In silicatischen Tonmineralen liegt Eisen vor allem in Form von Fe(III)-Oxiden vor (Scheffer und Schachtschabel, 2002). In der tetraedrischen Zwischenschicht sind austauschbare Ionen von Mg^{2+} , Fe^{2+} und Ca^{2+} eingelagert (Barrer, 1986; Nowikow, 1995). Im Vergleich zum unbehandelten Bentonit ändert sich bei Na-Bentonit die spezifische Enzymaktivität nicht, so dass die Alkali- und Erdalkalitionen in der Bentonit-Zwischenschicht nicht essentiell für die Bindung sind.

Hydroxylapatit besteht nach Kawasaki *et al.* (1985) vorwiegend aus dem zweiwertigen Erdalkalimetall Calcium.

Der Einfluss auf den Reaktionsverlauf lässt vermuten, dass die Ionen aus der festen Kristallstruktur als Bindestelle für die Fructosyltransferase fungieren. Bei Bentonit kann das Fe^{3+} und Al^{3+} sowie bei Hydroxylapatit Ca^{2+} trotz der Einbindung in das Kristallgitter auf die recFTF wirken.

Die 3-dimensionale Darstellung SacB aus *Bacillus subtilis* (Meng und Fütterer, 2003; PDB-Code: 1PT2; vgl. Abb. 2.4.6) zeigt, dass eine Ca^{2+} -Bindedomäne in den helikalen Strukturen am äußeren Rand des aktiven Zentrums eingebettet ist. Dies bietet durch die exponierte Position die Möglichkeit, dass sich elektrostatische Wechselwirkungen zu den gebundenen Kationen des Trägers ausbilden können, ohne die Aktivität zu beeinträchtigen.

Es finden sich bei *B. subtilis* und *S. salivarius* konservierte Aminosäurereste, welche die Calcium-Bindestelle koordinieren, jedoch in der restlichen GH 68 Familie variabel sind (Meng und Fütterer, 2003). Das bivalente Asp339 im DEIER₍₃₄₃₎-Motiv scheint danach die Bindung zu einem Metallion zu begünstigen und das Enzym zu stabilisieren.

Die spezifische Bindung an Bentonit wird durch das enthaltene Fe^{3+} vermittelt. Die Fe^{3+} -Ionen aus dem Kristallgitter des Bentonits werden nicht in die Reaktionslösung abgegeben. Für den Phosphatpuffer kann die Bindung von freien Eisen- und Calcium-Ionen zur Ca^{2+} -Bindedomäne ausgeschlossen werden, so dass die Ionen im Träger eine spezifische Adsorption vermitteln können. Bei Hydroxylapatit und Alginat wird die Adsorption hauptsächlich durch Wechselwirkungen zu Ca^{2+} -Ionen erfolgen. Fe^{3+} bzw. Ca^{2+} stabilisiert damit das Enzym und erhöht das Verhältnis von Transfructosylierung zur Hydrolyse.

Das EDTA im Denaturierungspuffer entfernt bei der Dialyse auch das in den inclusion bodies enthaltene Ca^{2+} aus der recFTF-Lösung, wodurch insbesondere die hohe Adsorptionsspezifität gegenüber der eisen- und calciumhaltigen Träger resultiert. Reste von EDTA können nach Lasowski *et al.* (2007) die Adsorption beeinträchtigen, da die Komplexbildung mit Trägerionen Bindestellen blockiert.

5.6.6 Einfluss von freien Ionen auf die Enzymaktivität der recFTF

Die in der Struktur der Träger enthaltenen Ionen bewirken eine deutliche Steigerung der Gesamtaktivität, was insbesondere eine starke Verlagerung auf die Transferaseaktivität einschließt (Abb. 5.6.10). Eine aktivierende Wirkung auf Fructosyltransferasen haben insbesondere 2 - 3-wertige Kationen mit einer Molekülmasse von 40 - 56 Da, wie Ca^{2+} (Ozimek *et al.*, 2005; Waldherr *et al.*, 2008; Song und Jacques, 1999 a), Fe^{2+} (Ben Ammar *et al.*, 2002) und Mn^{2+} (Esawy *et al.*, 2008; Szwengiel *et al.*, 2007). Mg^{2+} und Fe^{3+} wirken nach Esawy *et al.* (2008) eher inhibierend. Für Al^{3+} und Cr^{3+} ist bisher kein Einfluss dokumentiert.

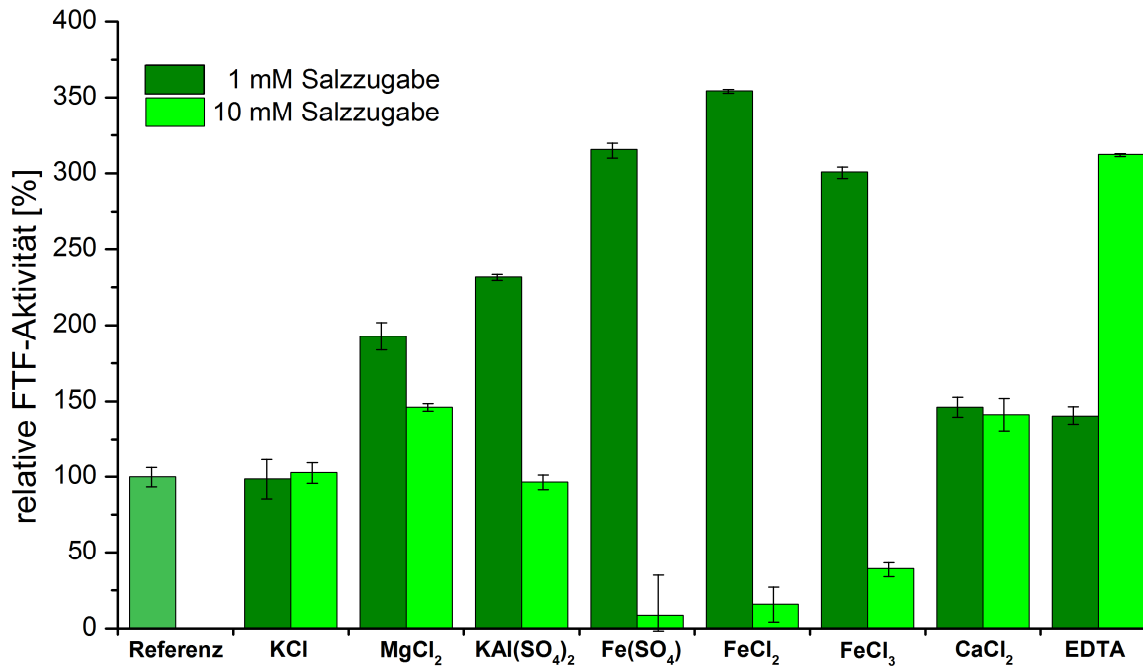


Abb. 5.6.10: Einfluss von freien Ionen unterschiedlicher Konzentration auf die Gesamtaktivität der recFTF_{Strep} (0,52 mg_{FTF}/ml) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0).

Das Aluminiumsalz $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ sowie die Salze des zweiwertigen Eisens FeSO_4 , FeCl_2 bzw. dreiwertigen Eisens FeCl_3 gehen unter den Reaktionsbedingungen nicht vollständig in Lösung. Das Ca^{2+} fällt im Phosphatpuffer teils zu unlöslichem $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ aus. Diese Suspensionen wirken ebenso aktivierend wie die Suspension mit Immobilisat.

Bei den gering konzentrierten Salzen mit 1 mM MgCl_2 , $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$, FeSO_4 , FeCl_2 , FeCl_3 wird eine 2 - 3-fach höhere Aktivität detektiert. Konzentrationen ab 10 mM an Aluminium- und Eisensalzen haben dagegen inaktivierende Wirkung auf die recFTF. Kalium ist bereits im Puffer enthalten und zeigt wie das Chlorid keinen aktivierenden Einfluss.

Esawy *et al.* (2008) zeigt für eine kovalent an Chitosan immobilisierte FTF mit 0,1 M Mg^{2+} eine 22 %-ige Aktivitätssteigerung. Nach Petit-Glatron *et al.* (1990) findet in Gegenwart von Ca^{2+} und Fe^{3+} eine Stabilisierung der FTF statt, so dass sogar die Rückfaltung denaturierter FTF unterstützt werden kann. Die inhibierende Wirkung von Fe^{2+} und Fe^{3+} auf FTF-Reaktionen (Esawy *et al.*, 2008; El-Refai *et al.*, 2009 a; Ben Ammar *et al.*, 2002) wird für die recFTF nicht festgestellt.

Mit 1 bzw. 10 mM weist Calcium etwa 45 % mehr Aktivität als die Referenz auf. Durch Zugabe von 1 mM Ca^{2+} kann eine Steigerung der spezifischen Aktivität sowie der Temperaturstabilität für die FTF aus *Lactobacillus reuteri* erreicht werden, wohingegen EDTA einen inaktivierenden Einfluss besitzt (Ozimek *et al.*, 2005). Die Zugabe von 0,1 - 1 mM EDTA bewirkt deutlich niedrigere FTF-Aktivitäten (Waldherr *et al.*, 2008; Petit-Glatron *et al.*, 1990). Die Zugabe von EDTA zeigt jedoch bis zu 3-fach höhere Aktivität. Dies kann auf eine Minderung intermolekularer Wechselwirkungen und folglich auf eine Stabilisierung hoher recFTF Konzentrationen hindeuten (vgl. Kapitel 5.4.4.4).

Bei der Auftrennung der Gesamtaktivität in Transferase- und Hydrolyseaktivität (Abb. 5.6.11 und Abb. 5.6.12) zeigt sich besonders für die 1 mM Aluminium- und Eisensalze eine sehr starke Steigerung der Transferasereaktion. Durch diese Salze wird das Reaktionsgleichgewicht der recFTF verschoben.

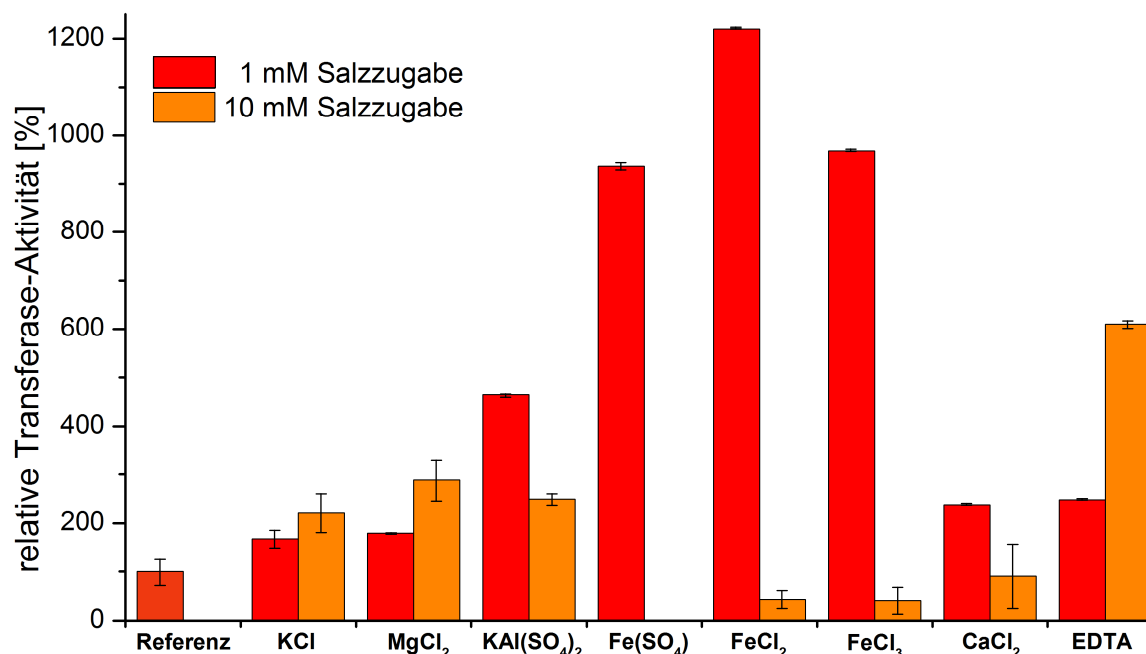


Abb. 5.6.11: Einfluss von freien Ionen unterschiedlicher Konzentration auf die Transferaseaktivität der recFTF_{Strep} (0,52 mg_{FTF}/ml) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0).

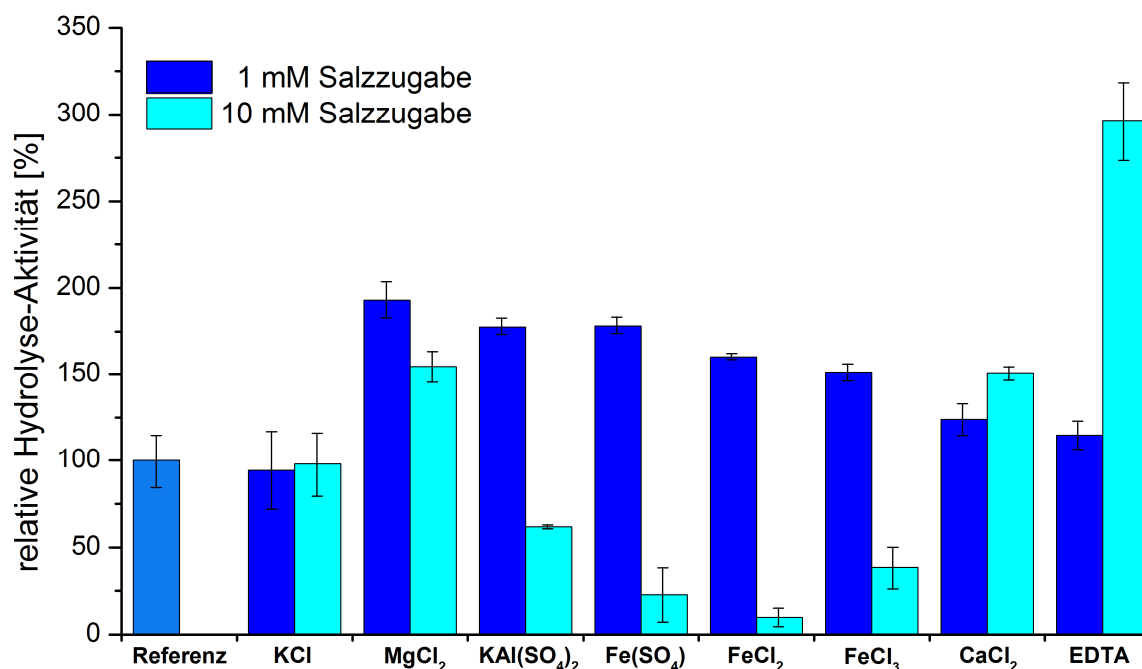


Abb. 5.6.12: Einfluss von freien Ionen unterschiedlicher Konzentration auf die Hydrolyseaktivität der recFTF_{Strep} (0,52 mg_{FTF}/ml) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0).

Die Transferaseaktivität kann bei den Eisensalzen um den Faktor 10 gesteigert werden, während die Hydrolyse nur um den Faktor 2 steigt. Auch das Aluminiumsalz zeigt eine deutliche Verlagerung zur Transferaseaktivität. 10 mM EDTA bzw. 10 mM Mg^{2+} zeigen lediglich leichte Veränderungen zugunsten der Transferaseaktivität. Das U_T/U_H -Verhältnis beträgt für die Referenz 0,22 und wird mit EDTA bzw. Mg^{2+} verdoppelt, mit 1 mM $KAl(SO_4)_2$ verdreifacht und mit 1 mM $FeSO_4$, $FeCl_2$, $FeCl_3$ um den Faktor 5 - 7,5 gesteigert.

5.6.7 Zusammenfassung unterschiedlicher Immobilisierungsmethoden

Die Träger unterscheiden sich wesentlich bei der elementaren Zusammensetzung, den elektrostatischen Eigenschaften und der Struktur (innere und äußere Oberfläche, Porosität, Homogenität, Tortuosität, etc.). Alle Transportprozesse sowie die kinetischen Eigenschaften am und im Träger werden dadurch entscheidend geprägt.

Die spezifischen Kenndaten der verwendeten Immobilisate mit einer hohen Bindekapazität werden in Tab. 5.6.9 den Werten für das freie Enzym gegenübergestellt.

Tab. 5.6.9: Kenndaten für die unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden in Bezug auf die freie Fructosyltransferase recFTF_{Strep}

	freies recFTF	Bentonit	Na-Bentonit	Hydroxylapatit	Alginat
Mittl. Partikel- durchmesser [µm]	-	14,2	12,0	5,5	900
Spez. Oberfläche [m ² /g]	-	41,2	44,2	65,0	-
Spez. Aktivität ^[1] [U _{FTF} /mg _{FTF,ads}]	-	56,4	52,2	98,1	-
Spez. Aktivität ^[2] [U _{FTF} /mg _{FTF,ads}]	39,4 ^[3]	66,6	66,0	94,3	157,2
Spez. Aktivität ^[2] [U _{FTF} /mg _{Ads}]	-	36,6	21,2	16,4	0,157
V_{imm}/V_{frei} für 0 - 0,5 min [%]	100,0 ± 2,3	5,5 ± 1,1	63,1 ± 0,6	43,2 ± 2,6	43,8 ± 6,1
V_{imm}/V_{frei} für > 0,5 min [%]	100,0 ± 0,1	138,4 ± 1,3	140,4 ± 0,3	190,7 ± 21,0	152,3 ± 13,9
$D_{eff}^{[5]}$ [cm ² /min]	-	-	-	-	1,58 * 10 ⁻⁶
$\Phi^{[5]}$ [-]	-	-	-	-	0,332
$\eta^{[5]}$ [%]	-	-	-	-	99,3
Restaktivität ^[4] nach 7 Tagen [%]	71,3 ± 9,3	96,6 ± 5,5	95,8 ± 9,2	89,1 ± 1,8	76,3 ± 5,1

^[1] berechnet aus q_{max} für $U_{FTF,ads}$ und $mg_{FTF,ads}$; ^[2] mittlerer Wert für experimentelle Daten mit einer Beladung > 0,1 mg_{FTF,ads} für $t > 0,5$ min; ^[3] angepasst um 30 % Anteil an inaktiver recFTF; ^[4] Restaktivität durch Desorption / Inaktivierung für kontinuierliche Durchmischung bei 4 °C, ^[5] für > 0,5 min bei 500 mM Saccharose und 37 °C.

Das freie Enzym weist eine spezifische Aktivität von 39,4 U_{FTF}/mg_{FTF} auf. Die spezifische Aktivität der Immobilisate steigt um den Faktor 1,4 bis 4. Das Alginatimmobilisat zeigt die

höchste spezifische Aktivität, da bei der Gelierung aufgrund des austretenden Wasseranteils ein Masseverlust von 46 % auftritt und dadurch eine Komprimierung des Enzymanteils in der Gelmatrix resultiert.

Besonders das unkonditionierte Bentonit zeigt mit $36,6 \text{ U}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ hervorragende Adsorptionseigenschaften. Die Bindung von Bentonit und Na-Bentonit ist besonders für die aktive recFTF spezifisch, da bis zu 70 % Enzym bzw. etwa 100 % der Enzymaktivität gebunden werden.

Während sich für Saccharose aus dem Konzentrationssprung deutlich geringere Reaktionsgeschwindigkeiten für die Immobilisate ergeben, zeigt sich für den Zeitraum $> 0,5 \text{ min}$ eine deutliche Beschleunigung gegenüber dem freien Enzym. Die kleinen Adsorbatpartikel sind in der Reaktionslösung fein verteilt und weisen damit eine große Adsorptionsfläche auf, so dass eine Diffusionslimitierung ausgeschlossen werden kann.

Die Alginatperlen weisen einen effektiven Diffusionskoeffizienten von $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ für einen porösen, kugelförmigen Träger auf. In Wasser beträgt der Diffusionskoeffizient für Saccharose $3,13 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{min}$ (Atkins und de Paula, 2010) und ist damit etwa 20-fach höher als für das Alginatimmobilisat. Die grobmaschige Porenstruktur ($\sim 16,6 \text{ nm}$ für 3 % Alginat nach Klein *et al.* (1983)) gewährleistet einen guten diffusiven Stofftransport. Im Vergleich zu Zwerenz (2012; $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{min}$) ergibt sich hier eine zusätzliche Diffusionslimitierung durch die Quervernetzung sowie durch die Anreicherung langkettiger Saccharide. Der Diffusionskoeffizient von Zwerenz (2012) ist trotz des doppelt so großen Perlendurchmessers mit (0,19 cm) gegenüber dem quervernetzten Alginatimmobilisat etwa 18-fach größer.

Der Thiele-Modul zeigt das Verhältnis von der Substratumsatzrate zum Stofftransport bei heterogenen Katalysatorsystemen auf. Der kleine Wert von 0,33 für das Alginatimmobilisat zeigt, dass die Reaktion vorrangig vom kinetischen Umsatz durch das Enzym abhängig ist. Die hohe Katalysatorkonzentration an der Trägeroberfläche bewirkt eine schnelle Umsetzung, ohne dass das Substrat sehr tief in den Katalysator eindringen muss.

Die adsorbierte recFTF zeigt eine sehr gute Langzeitstabilität gegenüber mechanischem Stress durch Partikelreibung, Scherkräfte sowie längerer Ultraschallbehandlung zur Resuspendierung der Partikel. Die Adsorbate zeigen mit -3,4 bis -4,2 % äußerst geringe Aktivitätsverluste. Die Enzymstabilität wird insbesondere bei der Adsorption an Bentonit deutlich verstärkt. Die Alginatimmobilisierung zeigt ein hervorragendes Rückhaltevermögen, weist aber eine ähnliche Stabilität wie das freie Enzym auf.

5.6.8 Integration der Adsorption bei der FTF-Renaturierung durch Dialyse

Der Einsatz von Trägermaterialien kann bei der Proteinrückfaltung zur Verbesserung der Ausbeuten an aktivem Enzym führen. Dabei wird der Effekt genutzt, Proteinmoleküle durch die Matrixwechselwirkungen voneinander zu separieren, damit die hydrophobe Aggregation des Proteins vermieden wird (Middelberg, 2002).

In einer Studie von Chambert und Petit-Glatron (1990) wird nachgewiesen, dass sowohl Ca^{2+} als auch Fe^{3+} die *in vitro* Rückfaltung denaturierter Fructosyltransferase vermittelt. Der stabilisierende Effekt ist bei beiden Ionen gleichermaßen stark ausgeprägt und weist bei der Rückfaltung Halbwertszeiten von wenigen Minuten auf. Um einen stabilisierenden Effekt von den Ca^{2+} bzw. Fe^{2+} -haltigen Trägermaterialien Hydroxylapatit bzw. Bentonit zu untersuchen, findet die Adsorption schon während der Rückfaltung statt. Die Trägerselektivität zum aktiven Enzym kann zudem die zurückgefaltete recFTF durch Adsorption aus der Renaturierungslösung ziehen und damit Aktivitätsausbeute steigern.

Die hohe Enzymstabilität der recFTF ermöglicht die Anwendung bei Raumtemperatur, was im Vergleich zur Adsorption bei 4 °C zu einer beschleunigten Diffusion führt. Damit kann nicht nur die Proteinrückfaltung und die Löslichkeit verbessert, sondern auch nach Wahlgren und Arnebrant (1991) die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes beschleunigt werden.

Die **Proteinkonzentrationen** der Überstände von Dialysat mit und ohne Träger sind in Tab. 5.6.10 dargestellt und im SDS-Gel dokumentiert (Abb. 5.6.13).

Tab. 5.6.10: Proteinkonzentrationen der Dialyseausgangslösungen und -überstände.

Probe	Resolubilisat [mg _{FTF} /ml]	Überstand [mg _{FTF} /ml]	gelöste Ausbeute [%]
Dialysat ohne Träger	1,39	0,32	23,3
	0,42	0,1	23,4
Dialysat mit Bentonit	1,39	0,22	15,6
	0,42	0,09	20,5
Dialysat mit Hydroxylapatit	1,39	0,24	16,9
	0,42	n.d.	n.d.

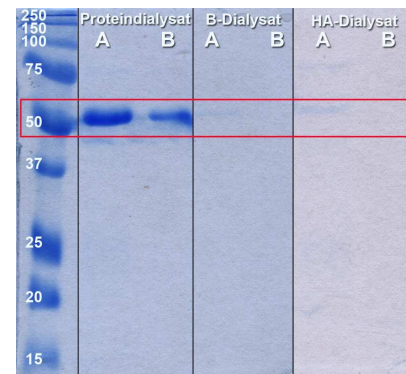


Abb. 5.6.13: SDS-Gel der Überstände vom Dialysat ohne und mit Träger: Bentonit (B) und Hydroxylapatit (HA) für A: 1,39 und B: 0,42 mg_{FTF}/ml.

Im Überstand ohne Träger werden 23 % des Proteins aus dem Resolubilisat nachgewiesen, während der Rest in Form von Proteinniederschlag ausfällt. Die Adsorption an die Trägermaterialien führt zu deutlich geringeren Proteinkonzentrationen in den Überständen. Bei Bentonit (B) und Hydroxylapatit (HA) sind 26 - 33 % weniger Protein in Lösung als bei der Referenz. Das SDS-Gel bestätigt deutlich kleinere Proteinkonzentrationen für die Proben mit Adsorbens.

Die Rückfaltung wird in Gegenwart von Bentonit nicht unterstützt und zeigt weder für die Suspension noch den Überstand FTF-Aktivität. Die denaturierte recFTF wird somit unspezifisch an Bentonit gebunden und kann durch Dialyse nicht weiter renaturiert werden.

Das Immobilisat aus der Rückfaltung/Adsorption mit Hydroxylapatit weist eine deutliche FTF-Aktivität auf. Da die aggregierten Proteinanteile nicht vom Träger separiert werden können, wird die Aktivität der Suspension sowie deren Überstand gemessen. Der stabilisierende Effekt der Ca^{2+} -Ionen in Hydroxylapatit kann bei der trägervermittelten Rückfaltung genutzt werden, um die aktive recFTF-Konformation zu stabilisieren und zu binden. Die aktive recFTF wird für Konzentrationen von 1,39 $\text{mg}_{\text{FTF}}/\text{ml}$ vollständig vom Träger adsorbiert (Anhang, Abb. 10.13.1). Auch für sehr hohe Enzymkonzentrationen zeigt die kombinierte Renaturierung reproduzierbare Ergebnisse mit deutliche höheren Aktivitäten für die Co-Adsorption mit Hydroxylapatit (Abb. 5.6.14).

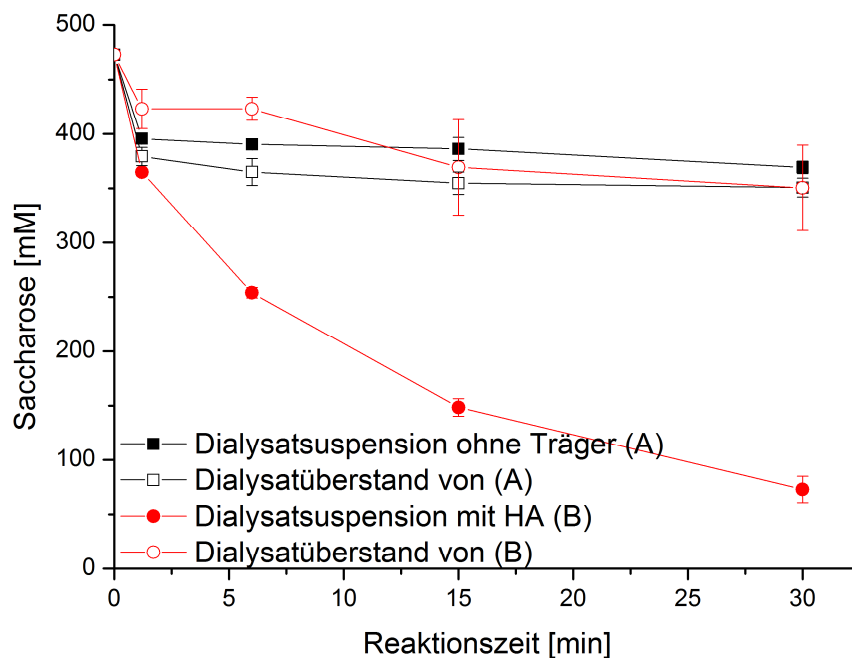


Abb. 5.6.14: Substratumsätze von Dialysatsuspension und -überstand für Resolubilisat mit 17,4 $\text{mg}_{\text{FTF}}/\text{ml}$ ohne Trägerzusatz und mit 6,6 mg/ml Hydroxylapatit.

Der Konzentrationssprung ist für die Hydroxylapatitsuspension höher als für die Referenzprobe. Die Reaktionsgeschwindigkeit liegt für die trägergebundene recFTF mit 10,1 mM/min etwa 10-fach höher als für das Proteindialysat. Der Überstand des Hydroxylapatitdialysates zeigt für die hohe Proteinkonzentration eine ähnliche Aktivität wie das Proteindialysat ohne Träger. Durch die Anwesenheit des Trägermaterials wird damit deutlich mehr aktives Enzym aus dem IB-Resolubilisat gewonnen. Dieser Rückschluss ergibt sich aus der Proportionalität der Aktivität zur Enzymmasse. Bei gleicher Menge aktiver recFTF wird für die adsorbierte recFTF generell eine geringere Aktivität bzw. ein kleinerer Konzentrationssprung detektiert (Abb. 5.6.8). Durch die Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes wird dem Überstand renaturiertes Protein entzogen, so dass die Aktivitätsausbeute durch das Hydroxylapatit deutlich gesteigert werden kann.

Analog zu den Adsorptionsversuchen mit der renaturierten, freien recFTF wird auch bei der Kombinationsmethode die Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität deutlich verschoben (Tab. 5.6.11). Gegenüber der Probe ohne Adsorbens wird das U_T/U_H -Verhältnis um das 7-fache gesteigert und die Aktivität deutlich auf die Transferasereaktion verlagert. Die Abnahme der Saccharosekonzentration steht im äquimolaren Verhältnis zur Glucosefreisetzung, was auf die Bildung von Fructan mit hohem Molekulargewicht hindeutet. Auch für den Konzentrationssprung bis 0,5 min zeigt die Suspension mit Hydroxylapatit ein Verhältnis von 3,3 für U_T/U_H .

Tab. 5.6.11: Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die freie und die adsorbierte recFTF_{Strep} für $t = 0 - 15$ min. Konzentrationsabnahme an Saccharose und Konzentrationszunahme an Glucose für $t = 0 - 0,5$ min.

freie und immobilisierte FTF	U_T [U/l]	U_H [U/l]	U_T/U_H [-]	$-C_{Sac\ ini}^{[1]}$ [mM]	$C_{Glu\ ini}^{[1]}$ [mM]	$C_{Glu}/C_{Sac}^{[1]}$ [-]
Dialysatsuspension ohne Träger	13039	24823	0,53	93,8	67,6	0,72
Dialysatsuspension mit Hydroxylapatit	213427	54748	3,90	118,8	117,2	0,99

^[1] für t bis 0,5 min

Die Bilanzierung der Reaktion zeigt auf, dass die Dialysatsuspension mit Hydroxylapatit 7 mal mehr Fructosemoleküle transferiert als deren Überstand bzw. die Referenz (Abb. 5.6.15 A). In Bezug auf den Saccharoseverbrauch ergibt sich ein relativer Anteil von 80 % Transfructosylierung (Abb. 5.6.15 B). Dagegen können ohne Adsorbenszusatz maximal 43 mM Fructose bei einem relativen Anteil von 32 % transferiert werden.

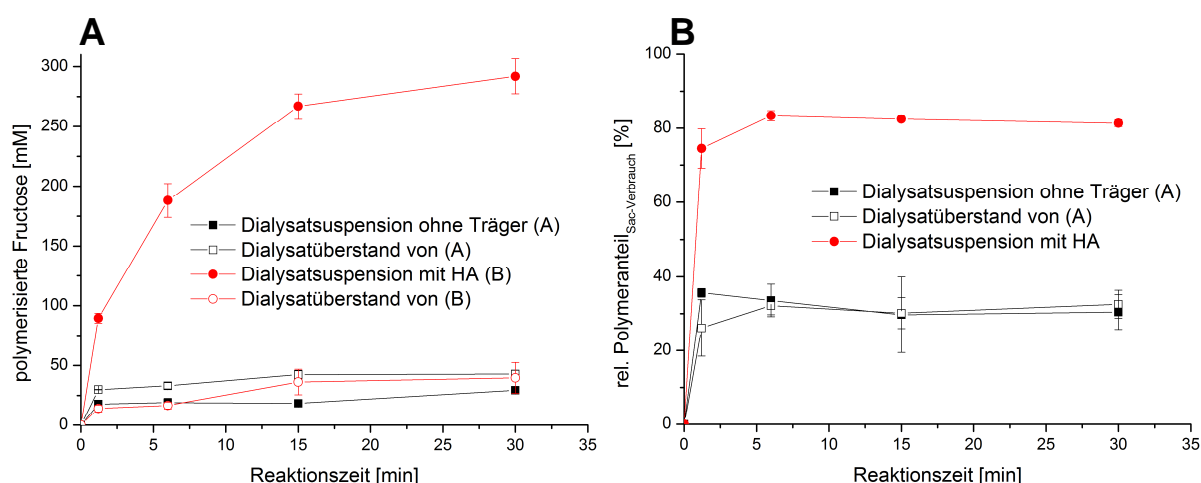


Abb. 5.6.15: Stoffliche Bilanzierung der Transfructosylierung mit Saccharose für die Suspension und den Überstand für die trägervermittelte Rückfaltung. 17,4 mg_{FTF}/ml ohne bzw. mit 6,6 mg/ml Hydroxylapatit werden eingesetzt: A: polymerisierte Fructose im Reaktionsverlauf, B: relativer Anteil polymerisierter Fructose zum Saccharoseumsatz.

Bei der Proteinsuspension zeigt sich im Vergleich zu deren Überstand, dass neben einer 2,5-fach höheren Aktivität auch ein verändertes Produktspektrum auftritt (Anhang 10.13.). Bei ähnlichem Saccharoseverbrauch baut die gelöste FTF des Überstandes etwa 5 mal weniger Fructose in Polymere ein als bei der Suspension. In der Probe ohne Proteinagglomerate ist der Anteil der Hydrolyse damit deutlich höher ausgeprägt. Der Proteinniederschlag ist folglich auch mit der spezifischen FTF-Polymerisierungsreaktion verbunden. Katalytisch aktive Elemente der FTF sowie korrekt gefaltete Proteinstrukturen können über ein großes Volumen miteinander assoziiert sein (vgl. Kapitel 5.4.5) und sind damit nicht im Überstand enthalten.

Die verwendete Methode muss hinsichtlich des diffusiven Stoffaustausches noch weiter optimiert werden, da die Dialysate noch ein Restharnstoffanteil von 2 - 3,4 % der ursprünglich eingesetzten Denaturierungslösung enthalten. Eine Diffusionslimitierung resultiert zum einen aus dem Luftanteil in der Kammer und zum anderen aus dem zwischenzeitlich auf die Membran abgesunkenen Trägermaterial.

Eine weitere Verbesserung der Enzymlöslichkeit sowie der Stabilität kann durch den Einsatz von chemischen Faltungsadditiven erreicht werden. Die Zugabe von L-Arginin wirkt beispielsweise einer Proteinaggregation entgegen (Tsutomu und Kouhei, 2003; Cirkovas und Sereikaite, 2011). Durch die Anlagerung an die Tryptophanreste hydrophober, partiell gefalteter Proteinstränge wird die Löslichkeit verbessert. Auch PEG oder hydrophobe PEG-Derivate (Gautam, 2012) sowie Glycerin, Heparin und Prolin (Meng *et al.*, 2001) können eingesetzt werden. Auch die Zugabe von Detergens zur Minderung der recFTF-Wechselwirkungen kann sowohl bei der Immobilisierung als auch bei der Enzymreaktion zu höheren Ausbeuten führen. Bei Ghiaci *et al.* (2009) wird durch eine Tensidbehandlung des Bentonits eine 44 %-ige Steigerung der adsorbierten Aktivität einer Lipase erreicht. Das Detergens muss hinsichtlich der späteren Produktaufreinigung berücksichtigt werden.

Durch die trägervermittelte Rückfaltung während der Dialyse kann eine anwendungsorientierte Implementierung zweier zweitaufwendiger Arbeitsschritte mit etwa 50 % Zeitersparnis erreicht werden. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zum Calciumanteil des Hydroxylapatits bewirken eine Steigerung der Aktivitätsausbeute. Die Rückfaltung kann durch Optimierung der Dialysebedingungen (Puffersystem, pH, Temperatur, stabilisierende Faltungsadditive) zu einer weiteren Ausbeutesteigerung adsorbierter aktiver recFTF führen. Im Gegensatz zum recyclebaren Proteinniederschlag aus der nicht kombinierten Dialyse, kann das agglomerierte Protein von dem Adsorbens nicht abgetrennt werden.

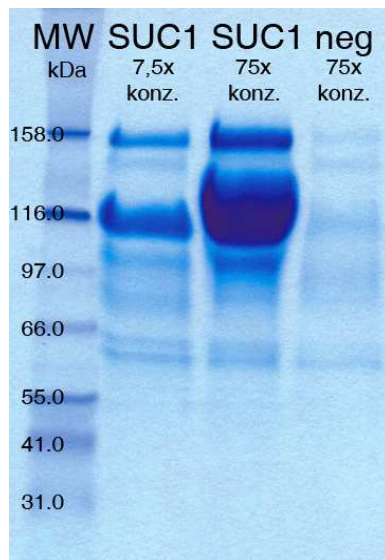
Die zeitliche Ersparnis muss allerdings auch mit der Langzeitstabilität, der Steigerung der Transferaseaktivität und den Rohstoffkosten für das Trägermaterial ins Verhältnis gesetzt werden. Das Bentonit ist mit 13 €/kg (Fa. Carl Roth; Stand 09.2014) wesentlich günstiger als die Hydroxylapatitlösung mit 2500 €/kg (Fa. Sigma; Stand 09.2014).

5.7 Produktion definierter FOS durch die β -Fructofuranosidase Suc1 aus *Aspergillus niger* AB 1.13

Die Kombination von zwei Fructosyltransferasereaktionen ermöglicht eine zielgerichtete Synthese von Fructooligosacchariden. Die mittels der recFTF synthetisierten Disaccharide des Saccharosetyps werden in einer zweiten Reaktion als Substrat mit der Suc1 zu neuartigen 1-Kestose und 1-Nystosederivaten umgesetzt.

5.7.1 Homologe Expression der Fructofuranosidase Suc1 durch *Aspergillus niger* AB 1.13

Das β -Fructofuranosidasegen ist im Plasmid pSKAn1015 (*suc1*⁺ *pyrG*⁺) in das Genom des uridinauxotrophen und proteasedefizienten *Aspergillus niger* Stamm AB 1.13 (*pyrG*⁻) integriert. Die homologe Überexpression und Sekretion der Suc1 wird durch die Induktion mit Saccharose bewirkt. Der rekombinante Stamm weist eine 130-fach höhere Enzymaktivität



als der Wildtypstamm auf. Für den Kulturüberstand wird eine spezifische Enzymaktivität von 1685 U/mg_{Suc1} ermittelt. Das eingesetzte Expressionssystem ist durch Roth und Dersch (2010) überdies auch zur intrazellulären Anreicherung modifiziert worden. Gegenüber der Schüttelkolbenkultivierung mit 140 U/ml kann durch Medienoptimierung und Kultivierung im Fed-Batch Verfahren die Aktivität des Rohüberstandes um das 20-fache auf 2800 U/ml gesteigert werden (Driouch *et al.*, 2010). Im Vergleich dazu hat der Rohüberstand einer *Aspergillus niger* Kultivierung lediglich 7,3 U/ml (Park und Almeida, 1991) bzw. 11,9 U/ml (Fernandez *et al.*, 2007).

Abb. 5.7.1: Aufkonzentrierte *Aspergillus niger* Kulturüberstände für die induzierte und rekombinante Proteinexpression mit pSKAn1015 (SUC1) im Vergleich zur nicht induzierten Expression des Kontrollstammes mit dem Leerplasmid SKANlp8 (neg). MW = Proteingrößenmarker.

Der Überstand der induzierten Kultur zeigt im SDS-Gel gegenüber der Negativkontrolle eine stark ausgeprägte Proteinbande bei etwa 120 kDa (Abb. 5.7.1). Die β -Fructofuranosidase Suc1 entspricht dem von Wallis *et al.* (1997) angegebenen Molekulargewicht von 125 kDa.

Durch die Saccharose werden auch Enzyme mit 100 und 160 kDa induziert. Dabei kann es sich um glycolytisch aktive Enzyme handeln, wie beispielsweise β -Glucosidasen mit Molekulargewichten von 105 - 109, 118, 200 kDa (Günata und Vallier, 1999; Le Traon-Masson und Pellerin, 1998; McCleary und Harrington, 1988; Seidle *et al.*, 2004) bzw. Glucoamylasen mit 53, 71, 91, 118, 125 kDa (Dubeya *et al.*, 2000; Slivinski *et al.*, 2011; Aalbæk *et al.*, 2002).

Da bei der Negativkontrolle keine glycolytische Aktivität und bei der rekombinanten Probe keine weiteren Produkte aus Nebenreaktionen nachgewiesen werden, beschränkt sich die Enzymaktivität ausschließlich auf die Suc1. Die sekretierte Suc1 ist stark glycosyliert. Mittels der Behandlung durch Glycosylasen (Endo H, PNGase F) lässt sich das Enzym bis auf die theoretisch errechnete Masse von 61,5 kDa reduzieren (Zuccaro *et al.*, 2008; Homann, 2009). Die Deglycosylierung zeigt nach Homann (2009) keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hinsichtlich der Produktbildung. Die oftmals diffusen Suc1-Proteinbanden im SDS-Gel, können nach Wallis *et al.* (1997) besonders durch Abweichungen des Glycosylierungsgrades infolge der starken Überexpression hervorgerufen werden. Zudem wird bei Invertasen aus *Aspergillus niger* die Ausbildung polydispenser Aggregate beobachtet (L'Hocine *et al.*, 2000). Die für den rekombinanten Stamm ebenfalls stärker ausgeprägten Proteinbanden bei 100 und 160 kDa können auch durch spezifische Engpässe und Zusammenlagerung bei der O- bzw. N-Glycosylierung hervorgerufen werden.

5.7.2 Kinetische Charakterisierung der Fructofuranosidase Suc1

Zur optimalen Einstellung der Reaktionsparameter wird der Einfluss von den physikochemischen Parametern Temperatur und pH-Wert auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht (Abb. 5.7.2).

Die Suc1 zeigt insbesondere aufgrund der stabilisierenden Eigenschaften durch die Glycosylierung ein hohes Temperaturoptimum und ein breites pH-Optimum. Nach Kainz *et al.* (2008) hat die Glycosylierung von heterolog sekretiertem Enzym aus *Aspergillus Spezie*s insbesondere einen Einfluss auf die Proteinstabilität. Die Optima entsprechen mit 50 - 55 °C bzw. pH 5 - 6 den in der Literatur veröffentlichten Werten (Park und Almeida, 1991; Nguyen *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2010). Gegenüber den Maximalwerten zeigt sich erst bei 70 °C eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit um 75 % bzw. bei pH 6,4 eine Verringerung um 48 %.

Die Suc1 weist mit 28,6 kJ/mol eine geringe Aktivierungsenergie für Saccharose auf. Rubio und Maldonado (1995) zeigen für eine Invertase aus *Aspergillus niger* mit 38,2 kJ/mol eine etwas höhere Aktivierungsenergie auf.

Die hohen Halbwertszeiten gegenüber der thermischen Denaturierung des Enzyms weisen bis einschließlich 40 °C auf eine hohe Enzymstabilität hin. Während bei 70 °C eine sofortige Inaktivierung festgestellt wird, wird für 50 °C eine Halbwertszeit von 7,6 h detektiert. Im Übergangsbereich verbleibt nach einer Stunde bei 60 °C eine Restaktivität von etwa 20 % ($t_{1/2} = 0,4$ h, nicht abgebildet).

Die Standardbedingungen für die Suc1-Reaktion werden auf eine Reaktionstemperatur von 40 °C bei einem pH von 5,4 in 50 mM Phosphatpuffer festgelegt.

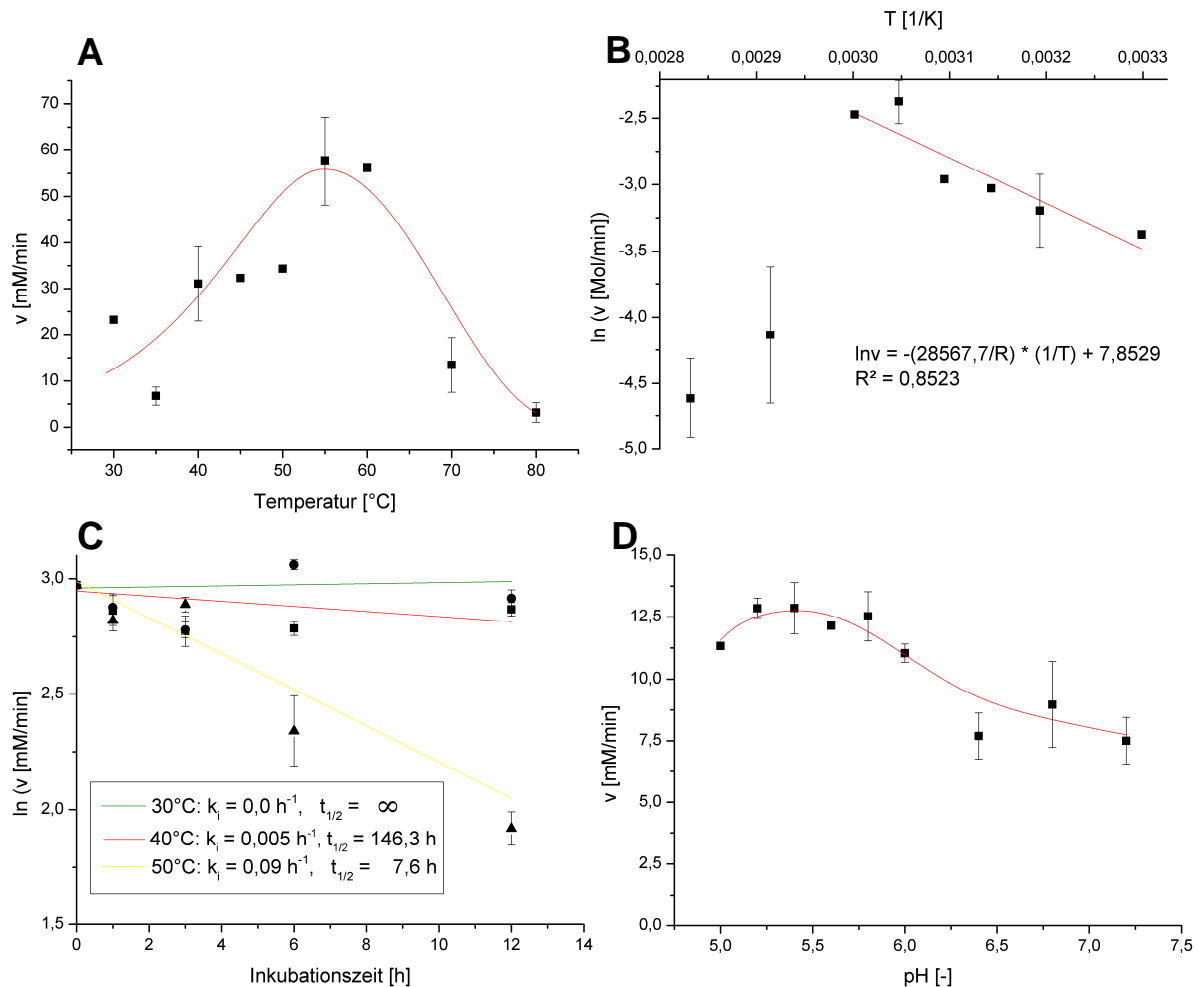


Abb. 5.7.2: Einfluss der Temperatur und des pH auf die katalytische Aktivität der Suc1:
 A: Temperaturabhängigkeit; B: Darstellung nach Arrhenius zur Ermittlung der Aktivierungsenergie; C: Temperaturstabilität thermostatisierter Enzymchargen zur Darstellung der Inaktivierungsraten und Halbwertszeiten; D: pH-Abhängigkeit.

In Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration zeigt sich für die Umsatzgeschwindigkeit ein sigmoidaler Verlauf, so dass für die Suc1-Reaktion keine eindeutige Bestimmung der kinetischen Parameter nach Michaelis Menten möglich ist (Abb. 5.7.3). Bei der Auftragung wird ein Grenzwert von etwa 35,0 mM/min bestimmt, welcher als v_{\max} eingesetzt einen theoretischen K_M von 256,9 mM ergibt.

Wallis *et al.* (1997) postulieren neben der Abweichung vom Verlauf nach Michaelis-Menten für die Substratkinetik einen multiplen K_M von 30 bzw. 160 mM, wobei kein eindeutiger v_{\max} feststellbar ist. Für intrazelluläre Invertasen aus *Aspergillus niger* können dagegen hohe Spezifitäten für Saccharose bestimmt werden: Die Werte für K_M und v_{\max} liegen bei 0,0625 mM und 1300 $\mu\text{mol/min}$ nach Rubio und Maldonado (1995), bei 2,0 mM und 6,6 $\mu\text{mol/min}$ nach Goosen *et al.* (2007), bei 44,4 mM und 1030 $\mu\text{mol/min}$ nach L'Hocine *et al.* (2000). Hirayama *et al.* (1989) stellen für eine β -Fructofuranosidase aus *Aspergillus niger* ATCC 20611 einen K_M von 290 mM fest und zeigen, dass das relativ auf Saccharose bezogene v_{\max} bei der Weiterreaktion für 1-Kestose nur 50 % und für 1-Nystose nur 0,01 %

beträgt. Es reichern sich daher auch für die Suc1 vorwiegend nur kurzkettige Produkte mit maximal drei Fructosylresten an.

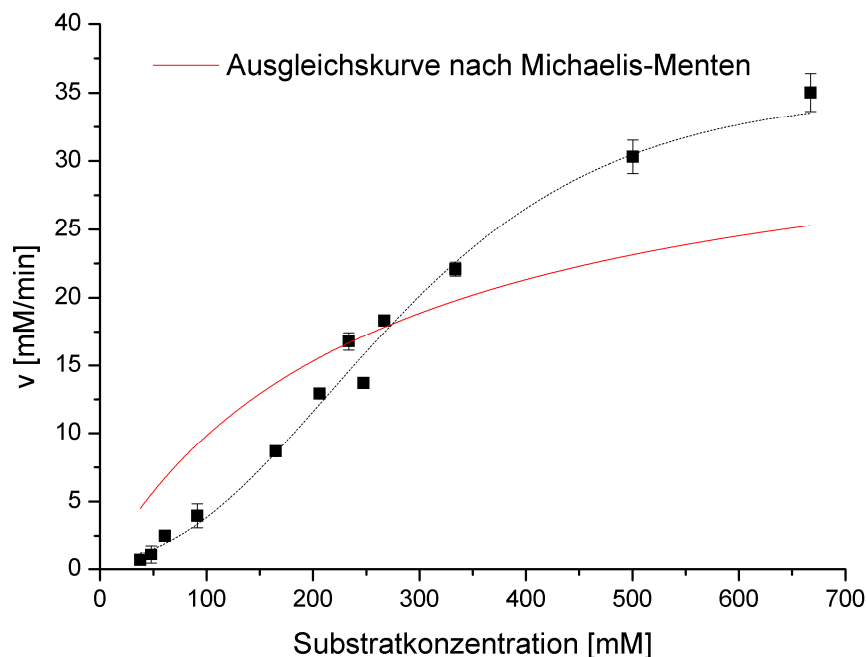


Abb. 5.7.3: Reaktionsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration und die Anpassung der Michaelis-Menten Funktion an die experimentell ermittelten Werte durch iterative Modellierung.

Für die Suc1-Reaktion können sehr hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden. L'Hocine *et al.* (2000) zeigen für eine β -Fructofuranosidase aus *Aspergillus niger* AS0023 ein Aktivitätsmaximum bei etwa 500 g/l Saccharose, während sich mit 800 g/l noch 75 % der Maximalaktivität nachweisen lassen. Für Saccharosekonzentrationen ab 500 g/l erzielen auch Sánchez *et al.* (2010) mit *Aspergillus sp.* N74 beste Bedingungen für die FOS-Produktion mit Selektivitäten von 90 %. Industrielle Anwendungen mit hochviskosen Saccharoselösungen sind dadurch realisierbar.

Die spezifische Aktivität der Suc1 beträgt unter Standardbedingungen 830,6 U/mg. Es wird dabei ein k_{cat} von 2097,9 1/s mit einer katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) von 8,2 1/(mM*s) erzielt.

5.7.3 Bilanzierung der Suc1-Reaktion mit Saccharose

Die Bilanzierung der Transfructosylierungsreaktion zeigt mit 234 mM Saccharose ein Umsatzmaximum von 43,1 % (Abb. 5.7.4 A). Bei hohen Saccharosekonzentrationen wird durch die starke Kestoseanreicherung auch bei kurzer Reaktionszeit deutlich Nystose gebildet, was den relativen Polymeranteil über 50 % hinaus ansteigen lässt. Auch Park und Almeida (1991) stellen für Saccharosekonzentrationen von 880 bzw. 1750 mM eine verstärkte Bildung von den höheren FOS 1-Nystose (34,6 bzw. 40,2 %) und 1-Fructofuranosyl-Nystose (0,5 bzw. 0,7 %) fest.

Trotz der Absättigung mit Saccharose steigt die Reaktionsgeschwindigkeit in Bezug auf die Transfructosylierung deutlich an (Abb. 5.7.4 B). Goosen *et al.* (2007) stellen bei der SacB für zunehmende Konzentrationen an Saccharose (≥ 200 mM) eine Aktivitätsverlagerung von der Hydrolyse zur Transfructosylierung fest. Die Suc1 zeigt eine lineare Zunahme der Transfructosylierungsaktivität, während die Hydrolyse gleichbleibend gering bleibt.

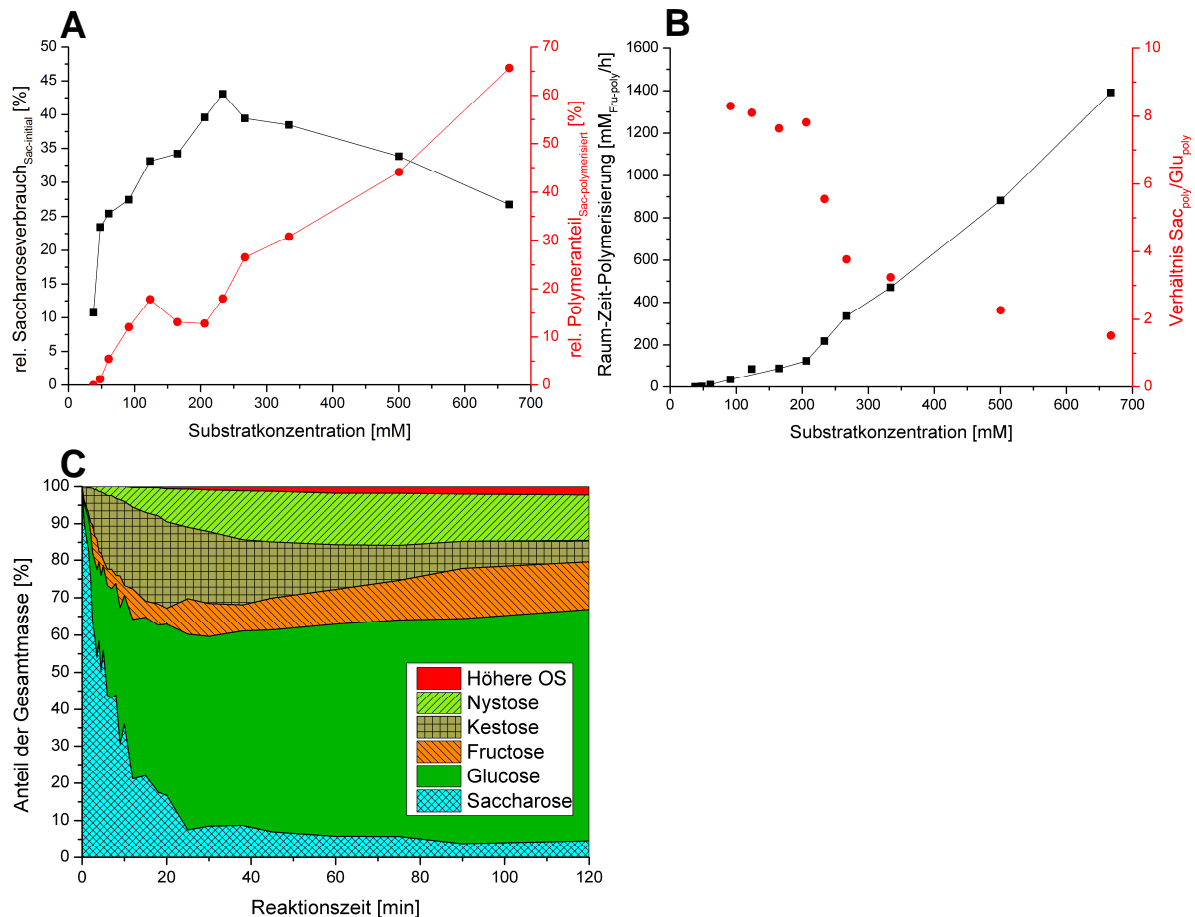


Abb. 5.7.4: Stoffliche Bilanzierung der Transfructosylierung für die Suc1 ($2,7 \cdot 10^{-4}$ mM): A: relativer Anteil an verbrauchter Saccharose (schwarz); relativer Anteil polymerisierter Fructose in Bezug den Saccharoseverbrauch (rot); B: Raum-Zeit-Fructosylierung (schwarz); Verhältnis polymerisierte Saccharose zu polymerisierter Fructose (rot); C: Massenbilanz für die Reaktion mit 270 mM Saccharose.

Für Saccharosekonzentrationen ≤ 234 mM wird mit einem Verhältnis von 7,9:1 ein deutlich höherer Substratverbrauch gegenüber der Glucosefreisetzung festgestellt, was besonders auf zuckerbindende Eigenschaften des Enzyms hindeutet. Die bindenden Eigenschaften gegenüber der Saccharose können durch Wechselwirkungen zur C-terminalen Sandwichdomäne, zu den Zuckerstrukturen auf der Enzymoberfläche oder zur katalytisch aktiven Bindungstasche des Enzyms hervorgerufen werden. In Glycoproteinen mit hohem Kohlenhydratanteil können starke intermolekulare Bindungen zu Kohlenhydraten resultieren (L'Hocine *et al.*, 2000). Für höhere Konzentrationen scheint es bei der Suc1 zu einer Absättigung dieser Wechselwirkungen zu kommen.

Aus Saccharose wird ausschließlich 1-Kestose und 1-Nystose gebildet, wobei Kestose nach 18 min und Nystose nach 60 min einen maximalen Masseanteil von 29,3 % bzw. 15,5 % erreicht. Zwischen den Produktmaxima von Kestose und Nystose wird generell mehr Kestose verbraucht als Nystose gebildet. Kestose dient damit auch als Fructosyldonor bei der Transfructosylierung, weist aber eine deutlich geringere Affinität als Saccharose auf. Der Einfluss der Hydrolyse wird nach Durchlaufen des zweiten Produktmaximums durch eine kontinuierliche Fructosefreisetzung angezeigt.

Der Hydrolyseanteil der Suc1-Reaktion ist sehr gering, so dass bis zu einem Restgehalt von 10 % Saccharose maximal 5 - 10 % Hydrolyse festgestellt werden können.

Die Transfructosylierungsaktivität (U_T) ist mit 244000 U/l im Vergleich zu anderen stark fructosylierenden β -Fructofuranosidasen aus *Aspergillus* Stämmen und *Aureobasidium pullulans* 6,3 bzw. 23,0 mal höher (Tab. 5.7.1).

Das Verhältnis U_T/U_H ist für die biotechnologische FOS-Synthese ein wichtiger Parameter zur Bewertung der Produktivität. Gegenüber den Literaturwerten ist das U_T/U_H -Verhältnis von der Suc1 zwischen 1,3 und 10,5 mal höher, was besonders für die FOS-Produktion eines industriellen Einsatzes interessant ist. Kurakake *et al.* (2010) stellen für die β -Fructofuranosidase F1 aus *Aspergillus oryzae* KB mit dem U_T/U_H -Verhältnis von 22 einen vergleichbaren Wert fest. Nach Chuankhayan *et al.* (2010) beinhaltet die Subsite +1 ~ +3 die Akzeptorspezifität und ist damit prägend für das U_T/U_H -Verhältnis.

Tab. 5.7.1: Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität verschiedener β -Fructofuranosidasen bei der Reaktion mit Saccharose.

Organismus	U_T [U/l]	U_H [U/l]	U_T/U_H [-]
<i>A. niger</i> AB 1.13 SKANip8	1080	880	1,2
<i>A. niger</i> AB 1.13 SKAn1015	244000	11000	21,0
<i>A. niger</i> ATCC20611 ^[1]	11870	750	15,9
<i>A. niger</i> ATCC9612 ^[2]	14200	1700	8,0
<i>A. niger</i> ^[4]	6000	1000	6,0
<i>A. niger</i> NRRL4337 ^[2]	5700	2800	2,0
<i>A. oryzae</i> IAM-2609pp13 ^[2]	3500	500	7,0
<i>Aureobasidium pullulans</i> ^[3]	47300	3310	14,3

(^[1] Fernandez *et al.*, 2007; ^[2] Hidaka *et al.*, 1988; ^[3] Yoshikawa *et al.*, 2006; ^[4] Park und Almeida, 1991)

Das U_T/U_H -Verhältnis ist beim überexprimierten Suc1-Überstand deutlich höher bei der Negativkontrolle, was auf eine konzentrationsabhängige Transfructosylierung oder auf Unterschiede bei der posttranslationalen Modifikation hindeutet, z. B. bei der Glycosylierung, von nativer und stark überexprimierter Suc1 (Zuccaro *et al.*, 2008).

5.7.4 FOS-Synthese durch die Fructofuranosidase Suc1

Neben der Reaktion mit Saccharose zur Produktion von 1-Kestose und 1-Nystose wird die Akzeptorreaktion mit Galactose und Xylose analog zu den Reaktionen mit der recFTF untersucht. Die Saccharoseanaloga Gal-Fru, Xyl-Fru, Man-Fru, Lac-Fru und Allo-Fru werden als mögliches Substrat zur Produktion von Kestose- und Nystosederivaten untersucht, woraus sich zudem ein struktursystematischer Ansatz für die Suc1-Reaktion ableitet.

5.7.4.1 Bildung von 1-Kestose und 1-Nystose aus Saccharose

Die Reaktion mit dem Substrat Saccharose erfolgt nach dem in Abb. 5.7.5 dargestellten Reaktionsschema. Neben Saccharose können auch die gebildeten Produkte 1-Kestose und 1-Nystose als Fructosyldonatoren zur Bildung höherer FOS verwendet werden.

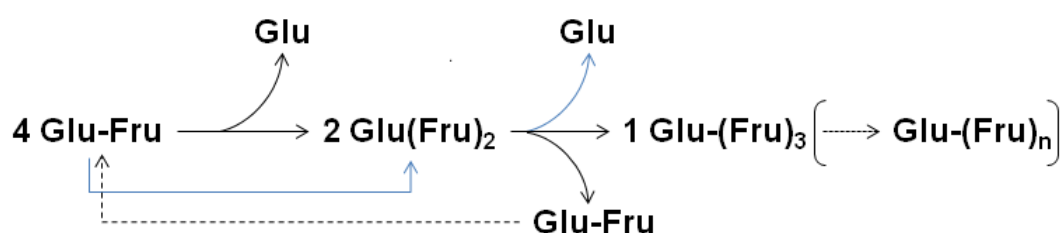


Abb. 5.7.5: Reaktionsschema zur Bildung höherer FOS, am Beispiel der Kestose- und Nystosesynthese (schwarz: Fructan:Fructan-Fructosylierung [Fructan=Substrat], blau: Saccharose:Fructan-Fructosylierung [Fructan=Akzeptor]).

Die Saccharosereaktion zeigt bei der Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie eine deutliche Anreicherung von kurzkettingen Fructooligosacchariden (Abb. 5.7.6). Die Fructooligosaccharide durchlaufen entsprechend ihrer Kettenlänge Konzentrationsmaxima, bei 1-Kestose nach 3 h und 1-Nystose nach 21 h Reaktionszeit. Hydrolyseprodukte und höhere Folgeprodukte als Glu-(Fru)₄ werden nicht detektiert.

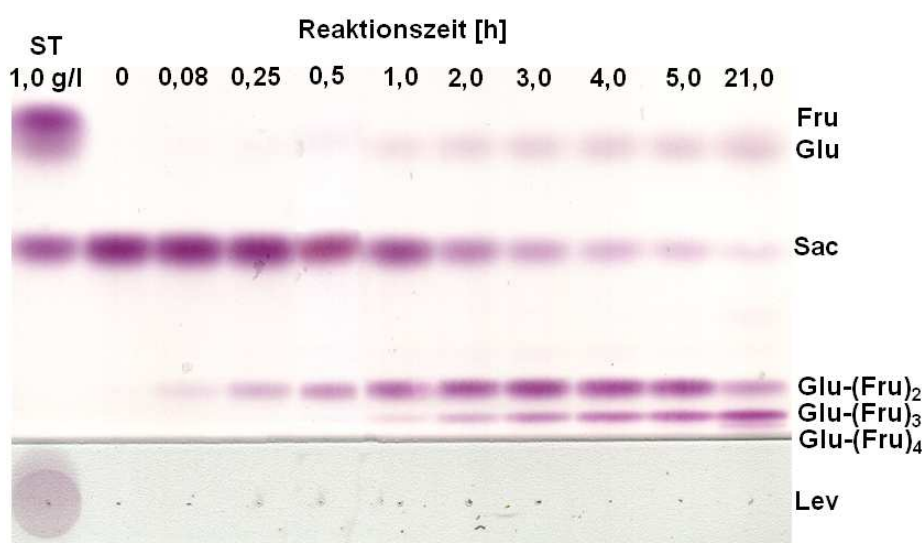


Abb. 5.7.6: Reaktion der Suc1 mit 0,5 M Saccharose in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0), 30,0 °C.

5.7.4.2 Akzeptorreaktion mit Galactose bzw. Xylose

Bei der Akzeptorreaktion mit Galactose wird kein Gal-Fru gebildet (Abb. 5.7.7). Die Reaktion verläuft ausschließlich zugunsten der Bildung von 1-Kestose und 1-Nystose aus Saccharose.

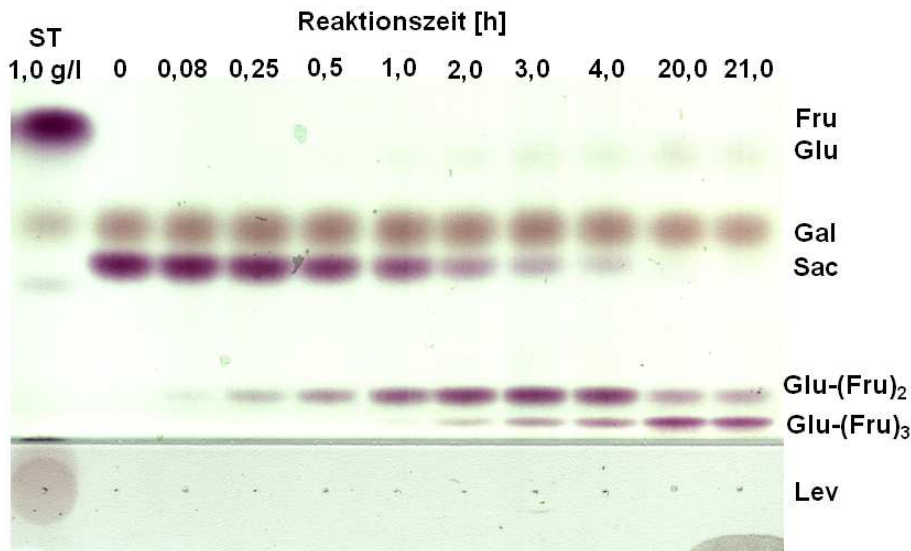


Abb. 5.7.7: Akzeptorreaktion der Suc1 mit 0,5 M Saccharose und 1,0 M Galactose in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) bei 30,0 °C.

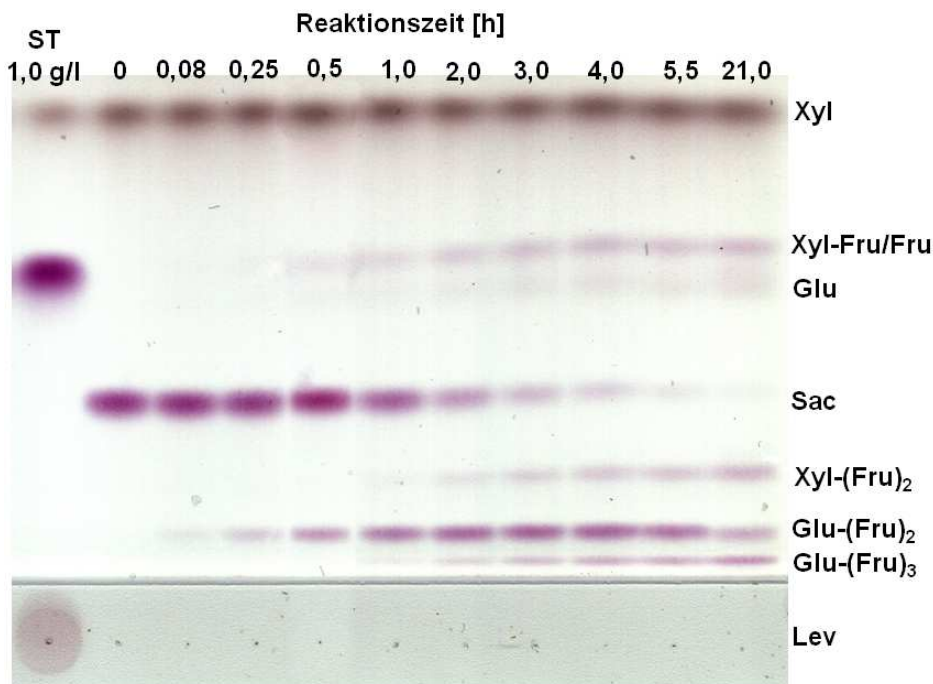


Abb. 5.7.8: Akzeptorreaktion der Suc1 mit 0,5 M Saccharose und 1,0 M Xylose in 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) bei 30,0 °C.

Mit Xylose als Akzeptor wird bei der DC-Auftrennung neben Kestose / Nystose auch die Anreicherung von Xyl-Fru und Xyl-(Fru)₂ aufgezeigt (Abb. 5.7.8). Während Xyl-Fru und Xyl-(Fru)₂ bis zum Ende der Reaktion angereichert werden, bilden sich für Kestose und Nystose analog zur Saccharosereaktion Produktmaxima aus.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Xylose zu Glucose kann in Bezug auf die freigesetzten Glucosekonzentrationen bei der Saccharosereaktion auf eine geringe Rückreaktion geschlossen werden. Eine Inhibierung durch die Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen ist wahrscheinlich. Chuankhayan *et al.* (2010) zeigen für eine β -Fructofuranosidase aus *Aspergillus japonicus* eine mögliche Inhibition durch Glucose in der Proteinstruktur des aktiven Zentrums. Eine weitere Steigerung der Suc1-Fructosylierungsrate ist durch einen Glucoseentzug möglich. Lin und Lee (2008) haben die inhibitorische Wirkung von Glucose durch die Co-Immobilisierung eines Glucoseoxidase-exprimierenden Stammes gemindert und damit die FOS-Ausbeute von 55 % auf 90 % gesteigert.

5.7.5 Herstellung von Fructooligosacchariden aus den Saccharoseanaloga

Mit Hilfe der Suc1 können gezielt kurzkettige Fructooligosaccharide aus den Saccharosederivaten Galactosyl-, Mannosyl- und Xylosylfructosid hergestellt werden. Lac-Fru und Allosaccharose werden von der Suc1 nicht als Substrat akzeptiert und zeigen keine Produktbildung.

Der Einsatz von Saccharoseanaloga als Substrat reichert vorwiegend kurzkettige Inulintyp-FOS mit 2 bis 3 Fructosyleinheiten an. Dabei entstehen Produkte mit unterschiedlichen Pyranosylköpfen der Struktur $\alpha X(1-2)\beta\text{Fru}[(2-1)\beta\text{Fru}]_n$ mit $X = \text{Glucosyl-}, \text{Galactosyl-}, \text{Xylosyl-}$ und $\text{Mannosyl-Kopfenden}$ und der Anzahl an Fructosylresten $n = 1 - 2$ (Abb. 5.7.9).

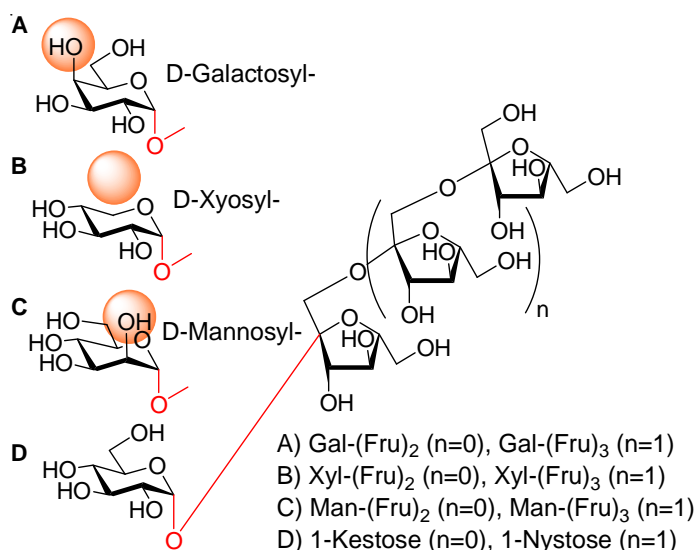


Abb. 5.7.9: Die mittels Substratvariation (Glu-, Gal-, Xyl-, Man-Fru) gewonnenen Produkte 1-Kestose und 1-Nystose sowie deren Strukturanaloga aus der enzymatischen Umsetzung durch die Suc1 aus *Aspergillus niger* AB 1.13.

Die Reaktionsprodukte aus Gal-Fru, Xyl-Fru und Man-Fru werden mittels Größenausschlusschromatographie isoliert und durch Massenspektroskopie, 1D und 2D NMR identifiziert (Anhang 10.14).

Die FOS-Synthese mit Saccharose oder den Saccharosederivaten durchläuft entsprechend der Substrataffinität Konzentrationsmaxima für die Produkte (Abb. 5.7.10; Tab. 5.7.2). Die Produktmaxima der Mannose-FOS sind leicht zeitverzögert zur Saccharosereaktion vergleichbaren Ausbeuten. Die Synthese von Gal-(Fru)₂ und Gal-(Fru)₃ erfolgt deutlich langsamer und zeigt eine 2-fach bzw. eine 3-fach geringere Ausbeute als mit Saccharose. Die Xylosylderivate werden nicht vollständig sondern nur bis zu etwa 25 g/l Xyl-(Fru)₂ bzw. 10 g/l Xyl-(Fru)₃ abgebaut.

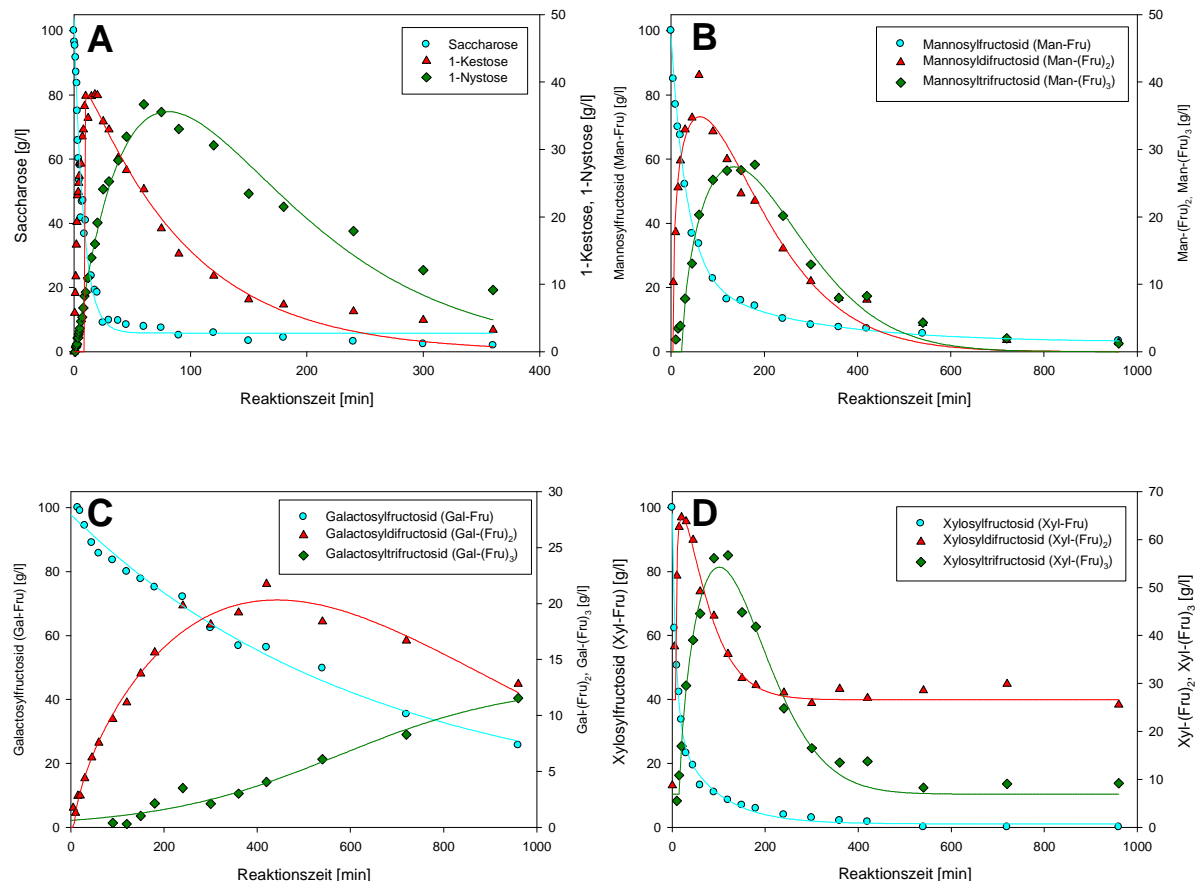
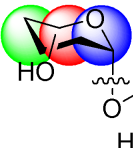
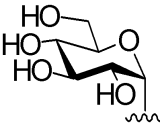
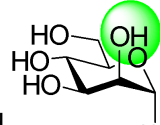
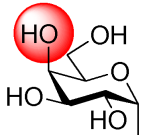
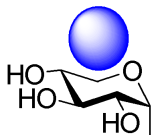


Abb. 5.7.10: FOS-Synthese aus Saccharose und Strukturanaloga mit der Suc1 (13,6 U/ml_{Reaktionslg}) unter Standardbedingungen: A) Bildung von 1-Kestose und 1-Nystose aus Saccharose; B) Bildung von Man-(Fru)₂ und Man-(Fru)₃ aus Man-Fru; C) Bildung von Gal-(Fru)₂ und Gal-(Fru)₃ aus Gal-Fru; D) Bildung von Xyl-(Fru)₂ und Xyl-(Fru)₃ aus Xyl-Fru.

Insgesamt ergibt sich, bezogen auf die eingesetzte Substratmenge, für Saccharose 59,3 %, für Man-Fru 57,9 %, für Gal-Fru 36,1 % und für Xyl-Fru 72,3 % FOS-Ausbeute. Literaturwerte für β -Fructofuranosidasen aus *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus aculeatus*, *Aurebasidium pullulans* beschreiben für Saccharose FOS-Ausbeuten von etwa 51 - 61 % (Yoshikawa *et al.* 2007; Kurakake *et al.*, 2010; Sangeetha *et al.*, 2004; Ghazi *et al.*, 2007; Mabel *et al.*, 2008, Sánchez *et al.*, 2010).

Tab. 5.7.2: Enzymatische Synthese von FOS aus Saccharose sowie deren Strukturanaloga Man-Fru, Gal-Fru und Xyl-Fru als jeweils einziges Substrat.

		Zeit	Umsatz	Ausbeute am Optimum	
		[min]	[%]	[g/l (%)]	
Saccharose		18	80,3	Glu-(Fru)₂	Glu-(Fru)₃
		60	92,2	38,2 (51,8)	16,0 (24,7)
				24,1 (32,7)	36,7 (56,5)
				14,62	1,17
v _{Bildung-initial} [mM/min]					
Selektivität [-]				0,64	0,61
Mannosylfructosid		60	66,4	Man-(Fru)₂	Man-(Fru)₃
		180	85,8	41,0 (55,7)	20,3 (31,3)
				22,4 (30,4)	27,8 (42,8)
				3,19	0,58
v _{Bildung-initial} [mM/min]					
Selektivität [-]				0,84	0,50
Galactosylfructosid		420	43,7	Gal-(Fru)₂	Gal-(Fru)₃
		960	74,3	21,8 (29,5)	4,1 (6,2)
				12,8 (17,4)	11,5 (17,8)
				0,24	0,04
v _{Bildung-initial} [mM/min]					
Selektivität [-]				0,68	0,24
Xylosylfructosid		20	66,3	Xyl-(Fru)₂	Xyl-(Fru)₃
		120	91,5	63,9 (84,1)	16,9 (24,9)
				31,3 (41,2)	56,7 (83,5)
				10,53	1,90
v _{Bildung-initial} [mM/min]					
Selektivität [-]				1,27	0,91

Generell zeigt die Suc1 insbesondere durch die polaren Aminosäurereste der weiten Bindungstasche eine gute Substratzugänglichkeit. Die **struktursystematische Variation** der Substratmoleküle gibt Aufschluss über die Wechselwirkungen zum Enzym.

Bei der Suc1 ist die äquatoriale Ausrichtung der **C3-Hydroxylgruppe am Glucopyranosylrest** essentiell für die Bindung des Substrates, da Allosaccharose mit einer axialen OH-Gruppe am C3 von der Suc1 nicht umgesetzt wird. Die Wechselwirkungen mit der äquatorial orientierten OH-Gruppe am **C4** sind für eine effiziente Umsetzung wichtig aber nicht zwingend, da Gal-(Fru)₂ 60 mal langsamer als 1-Kestose gebildet wird und deutlich kleinere Ausbeuten aufweist. Für die Akzeptorreaktion mit einem Monosaccharid ist die Ausrichtung der C4-Gruppe jedoch sehr wichtig, da selbst hohe Galactosekonzentrationen

das Gleichgewicht der Reaktion mit Saccharose nicht beeinflussen können. Auch die intrazelluläre SucB aus *Aspergillus niger* zeigt neben der Kestose/Nystosebildung keine weiteren Akzeptorprodukte mit Galactose (Goosen *et al.*, 2007). Eine Verlängerung der C4-Gruppe, wie sie beim eingesetzten Lac-Fru durch die β -(1,4)- α -Bindung eines Galactosylrestes zur Saccharose besteht, zeigt ebenfalls keine Umsetzung dieses Substrates. Durch die große räumliche Struktur des Galactosylrestes wird nicht nur die Anlagerung sondern wahrscheinlich auch die zur Reaktion notwendige Ausbildung der Wechselwirkungen zur benachbarten C3-Hydroxylgruppe sterisch behindert.

Die **C6**-Gruppe des Glucopyranosylrestes ist nicht essentiell für die Suc1-Reaktion. Für die fehlende C6 Gruppe bei Xyl-Fru werden besonders hohe Reaktionsgeschwindigkeiten und auch deutlich höhere Ausbeuten als bei der Reaktion mit Saccharose erzielt. Weiterhin zeigt sich bei der Akzeptorreaktion mit Xylose die Bildung von Xyl-Fru, welche vermutlich durch die äquatoriale OH-Gruppe am C4 und die fehlende C6-Gruppe begünstigt und damit in Konkurrenz zur Rückreaktion mit freigesetzter Glucose steht. Darüber hinaus zeigt auch Homann *et al.* (2012), dass analog zur axial ausgerichteten OH-Gruppe am C4 beim Gal-Fru und der Variation vom C6-Rest bei Saccharose bzw. bei Xyl-Fru auch die kombinierte **C4/C6**-Veränderung bei Fuc-Fru als Substrat akzeptiert und zu Fuc-(Fru)₂ bzw. Fuc-(Fru)₃ umgesetzt wird. Die SucB zeigt auch für eine **verlängerte C6-Gruppe** der Glucose bei Raffinose und Stachyose (α -(1,6)- α gebundene Galactosylreste) eine Hydrolyse des Saccharoseteiles (Goosen *et al.*, 2007). Dabei ist die α -(1,2)- β -Bindung zwischen dem Pyranose- und Fructoserest zur Umsetzung zwingend notwendig, was durch die struktursystematische Variation der Monomere gezeigt wird. Des Weiteren stellen auch Hirayama *et al.* (1989) bei einer β -Fructofuranosidase aus *Aspergillus niger* ATCC 20611 für Raffinose und Stachyose eine Transfructosylierung in Gegenwart von Saccharose fest.

Durch die hohe Substrat- und Akzeptorspezifität wird der Spielraum für alternative Reaktionswege deutlich eingeschränkt. Jedoch werden besonders für die zielgerichtete Synthese der kurzkettigen FOS sehr hohe Ausbeuten erzielt. Beine *et al.* (2008) zeigen mit einer recFTF-Variante (N242H) lediglich für Xyl-Fru als Substrat eine verstärkte Synthese von kurzkettigen Levantyp-Xyl-FOS, wobei maximal 17 % Xyl-Fru₂ und 2 % Xyl-Fru₃ angereichert werden. Dabei werden sowohl mit der wt-recFTF als auch deren N242H-Variante keine kurzkettigen FOS aus Gal-Fru, Fuc-Fru, Man-Fru hergestellt, sondern vorwiegend hydrolysiert und/oder gleich zu langkettigen Levanen umgewandelt. Die Suc1 weist damit für Xyl-(Fru)₂ 3-fach und für Xyl-(Fru)₃ sogar 21-fach höhere Ausbeuten auf. Zudem können durch die Suc1 auch Gal-(Fru)_{2/3} und Man-(Fru)_{2/3} stark angereichert werden.

Bei der Synthese von speziellen Inulooligosacchariden weist die Transfructosylierung durch die Suc1 hohe Ausbeuten definierter Produkte auf. Dadurch entsteht gegenüber der hydrolytischen Spaltung, wie sie beispielsweise von Nakamura *et al.* (2001) mit einer Endo-Inulinase beschrieben wird, ein deutlicher Vorteil bei der Aufreinigung der Produkte.

6 Zusammenfassung

Glycosidstrukturen beinhalten eine Vielzahl von Funktionen bei lebenswichtigen Prozessen. Aufgrund der vielseitigen Eigenschaften von Oligosacchariden steht die zielgerichtete Synthese im Interesse von Wissenschaft und Industrie im Pharma-, Kosmetik- und Ernährungsbereich. Der enzymtechnologische Einsatz von Glycosyltransferasen bietet durch die gezielte stereo- und regioselektive Verknüpfung von Kohlenhydraten ein hohes Potential für effiziente Stoffumwandlungen.

In dieser Arbeit wurde die Produktion, Aufreinigung, Charakterisierung und Immobilisierung einer Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 untersucht, welche zur Synthese von Saccharosederivaten eingesetzt wurde. Eine β -Fructofuranosidase aus *Aspergillus niger* AB1.13 wurde für die zielgerichtete Synthese von weiteren FOS-Derivaten mit unterschiedlichen endständigen Glycopyranosylköpfen charakterisiert.

Die extrazelluläre Fructosyltransferase konnte aus dem Kulturüberstand von *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 gewonnen werden. Unter limitierenden Bedingungen und der Zugabe von Saccharose als C-Quelle wird die Sekretion der FTF induziert. Die Enzymausbeute konnte durch die Kultivierungsbedingungen nur geringfügig beeinflusst werden. Der Zusatz von Komplexbestandteilen bewirkte ein schnelleres Bakterienwachstum, aber auch eine deutlich geringere FTF-Freisetzung. Unter optimalen Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben wurden nach 35 h im Minimalmedium bei neutralem pH und 37°C maximal 4 mU/ml festgestellt. Eine Kultivierung im Bioreaktor zeigte durch die pH-Regulierung und den effektiven Sauerstoffeintrag lediglich eine Verkürzung der Kultivierungszeit auf 11 h. Die Erhöhung des Stickstoff- und Kohlenstoffgehaltes führte maximal zu einer Aktivitätssteigerung um 40 %. Die zusätzliche N-Zugabe mit Beginn der stationären Phase stellte sich mit 60 % höherer Aktivitätsausbeute als besonders effektiv heraus.

Die notwendige Aufkonzentrierung wurde durch verschiedene Ultrafiltrationsverfahren ermöglicht, führte aber zu Aktivitätsverlusten von bis zu 80 %. Für die präparative Separation wurden chromatographische Trennmethoden mit Resource Q, Source 30Q und CM Sepharose untersucht. Resource Q und Source 30Q zeigten eine 8,6-fache Anreicherung der FTF-Aktivität. Obwohl mit CM Sepharose die 16-fache Anreicherung erreicht wurde, zeigte Source 30Q neben einer kürzeren Verweilzeit auch eine deutlich schnellere Regeneration des Materials.

Die großen Kulturvolumina, die geringe FTF-Konzentration und die Anreicherung von Levan erschwerte die Aufarbeitung der sekretierten FTF. Daher wurde eine heterologe Überexpression der FTF in *Escherichia coli* umgesetzt. Es konnte eine 50 kDa große Fructosyltransferase isoliert und die entsprechende Gensequenz identifiziert werden. Das Enzym wurde als SacB identifiziert, welches auf DNA-Ebene 14 stille Mutationen beinhaltet.

Bei der rekombinanten Expression in *E. coli* BL21 wurden für die recFTF_{His} bis zu 6 U/ml im Zellextrakt detektiert. Die recFTF_{His} konnte nicht durch affinitätschromatographische Aufreinigung isoliert werden, was auf eine konformale Unzugänglichkeit oder den Verlust des His-Tags schließen lässt. Mit hohen Ausbeute- und Aktivitätsverlusten konnte das Enzym mittels Resource Q Chromatografie um den Faktor 37 aufgereinigt werden.

Da bei der recFTF_{His} in Abhängigkeit vom assimilatorischen Stress zwei unterschiedlich große und schwer separierbare Translationsprodukte gebildet wurden, war eine alternative Expressionsstrategie für die Produktion notwendig. Das Enzym wurde mit der recFTF_{Strep} um die Signalsequenz verkürzt und mit einem Strep-Tag fusioniert. Die Expression in *E. coli* Rosetta erzielte mit 370 U/ml für die recFTF_{Strep} 62 mal mehr Aktivität im Zellextrakt als bei der recFTF_{His}. Die Verkürzung um 23 Aminosäuren, die mannigfaltige Zusammensetzung des Affinitätstags sowie die Coexpression seltener t-RNAs minderten den assimilatorischen Expressionsstress und führten zu einem einheitlichen Translationsprodukt.

Die gelöste recFTF_{Strep} konnte mittels Strep-Tactin Chromatografie in einer Reinheit von 90 % aus dem Zellextrakt isoliert werden. Ein deutlich größerer Anteil liegt in Form von unlöslichen inclusion bodies vor. Diese können leicht aufgearbeitet werden, so dass 30 % der Zellpelletfeuchtmasse als einheitliche und hochreine FTF-Charge isoliert werden konnten. Der optimale Erntezeitpunkt zur Gewinnung von inclusion bodies ist zu Beginn der stationären Phase. Eine Absenkung der Kultivierungstemperatur auf 28 °C führte zu 35 % weniger inclusion bodies. Mit zunehmendem Ultraschallenergieeintrag wird die FTF aus den inclusion bodies gelöst, was tendenziell die Ausbeute mindert, jedoch ermöglicht es eine effektive Abtrennung des intrazellulären Proteinanteils. Die Bioreaktorkultivierung birgt durch die Kontrolle der Kultivierungsparameter insbesondere im Fed Batch Verfahren nochmals deutliche Steigerungen bei recFTF Ausbeute.

Da die recFTF keine Disulfidbrücken enthält, kann die Renaturierung mittels Dialyse einfach und effizient durchgeführt werden. Dabei fielen etwa 90 % des Proteins aus, wobei das Dialysepräzipitat gut gelagert und auch mehrfach zur Renaturierung eingesetzt werden kann.

Während der Ausbeuteverlust bei der Strep-Tactin Aufreinigung inklusive Dialyse 98 % betrug, konnte dieser bei der Renaturierung der inclusion bodies schon im ersten Dialysedurchgang auf 93 % gesenkt werden. Die spezifische Aktivität der renaturierten Chargen betrug 264,9 U/mg und war damit 5 mal höher als bei der Strep-Tactin Aufreinigung und etwa 100 mal höher als bei den Zelllysatüberständen.

Durch das enzymespezifische Agglomerationsverhalten stellte sich bei etwa 3,0 mg/ml gelöste recFTF eine Sättigung ein. Die Zugabe von 1 % (v/v) Triton X-100 störte die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen und bewirkte eine Aktivitätszunahme von 36 %.

Für die nativ produzierte FTF sowie die rekombinanten Varianten der recFTF_{His} und recFTF_{Strep} wurden die kinetischen Parameter für die Saccharoseumsetzung ermittelt. Das Temperaturmaximum der recFTF beträgt 53 °C und für den Arbeitsbereich von ≤ 37 °C ist das Enzym temperaturstabiler als andere FTFs. Im Bereich von pH 5,6 - 6,0 besitzt die FTF ein breites pH-Optimum, welches durch eine besonders starke Aktivitätsabnahme für pH-Werte $> 7,0$ geprägt ist.

Bei der Reaktion mit Saccharose werden primär langkettige Polyfructoside des Levantyps gebildet, wobei die Reaktion der recFTF_{His} 45,1 % Hydrolyse und die recFTF_{Strep} 65 % Hydrolyse aufweist. Die recFTF_{His} verhält sich mit einem K_M von 7,4 mM entsprechend der wt-FTF. Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde bei der recFTF_{Strep} durch einen sprunghaften Substratverbrauch für $t \leq 0,5$ min erschwert. Gegenüber der nachfolgenden Reaktion wurde eine 10-fach höhere Reaktionsgeschwindigkeit detektiert. Dies Verhalten kann bei Enzymen mit einem Ping-Pong-Mechanismus nach Hartley und Kilby (1954) auf die sogenannte Burst-Phase sowie die Bildung von Polymerköpfen zurückgeführt werden. Der sprungartige Substratverbrauch war dabei direkt von der Enzymkonzentration abhängig, wobei die Polymerisierung geschwindigkeitslimitierend wirkt. Daraus ergaben sich für die recFTF_{Strep} zwei K_M Werte: 33,3 mM für $t \leq 0,5$ min und 132,3 mM für $t > 0,5$ min.

Nach Beine (2009) ist die Produktausbeute im Wesentlichen vom Verhältnis Enzym:Donor:Akzeptor abhängig. Besonders in Gegenwart von Glucose oder anderen Monosaccharidakzeptoren wird das Reaktionsgleichgewicht entscheidend beeinflusst. Bereits mit 10 % Glucose verschiebt sich das Quasi-Gleichgewicht so stark zur Rückreaktion, dass der Hydrolyseanteil um 33 % stieg. Durch einen Glucoseentzug kann die Syntheseeffizienz gesteigert und die Wirkung dieser Konkurrenzreaktion gemindert werden.

In Gegenwart eines guten Akzeptors, wie Xylose oder Galactose, wird die Polymerbildung und die Hydrolyse deutlich reprimiert, wobei Ausbeuten von mehr als 50 % für die kurzkettigen Akzeptor-FOS erreicht werden. Die Akzeptorstärke wird wesentlich durch die Stellung der C4 und C6-Gruppen am Pyranosering geprägt. Das U_T/U_H -Verhältnis wurde von 1,3 bei der Saccharosereaktion auf 15,4 für die Galactose- bzw. 26,6 für die Xylose-Akzeptorreaktion verschoben. Im Vergleich zur wt-FTF konnte zum einen die FOS-Ausbeute um das 3-fache gesteigert und zum anderen die verbleibende Restsaccharose um das 4-fache reduziert werden. Raffinose kann alternativ als Fructosyldonator eingesetzt werden, da diese eine adäquate Selektivität zur Saccharose aufweist.

Die Immobilisierung an Trägermaterialien stabilisiert die recFTF gegenüber denaturierenden Einflüssen und ermöglicht eine ökonomische, prozessorientierte Anwendung. Die kovalente Immobilisierung an Eupergit C zeigte im Gegensatz zur Adsorption an Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit nur sehr geringe Protein- und Aktivitätsbeladungen. Unkonditioniertes Bentonit zeigte als bestes Adsorbens hinsichtlich der Protein- und Aktivitätsbeladung mit $0,834 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ und $47,0 \text{ U}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ doppelt so hohe Kapazitäten als Na-Bentonit. Mit den Bentoniten wurden bis $1,1 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{ml}$ 100 % der Aktivität sowie 70 % des Proteins immobilisiert, so dass besonders aktive recFTF_{Strep} spezifisch an Bentonit bzw. Na-Bentonit adsorbiert wird. Hydroxylapatit zeigte mit $0,2 \text{ mg}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ und $19,7 \text{ U}_{\text{FTF}}/\text{mg}_{\text{Ads}}$ eine geringere Beladungskapazität.

Die Immobilisate wiesen eine deutlich höhere spezifische Aktivität auf als das freie Enzym. Hydroxylapatit zeigte einen um 30 % stärker aktivierenden Einfluss als die Bentonite. Neben der Transfargeschwindigkeit stieg auch der Transfructosylierungsanteil signifikant für die Adsorbate mit Bentonit auf 50 % und Hydroxylapatit auf 71,5 % an. Im Vergleich zum freien Enzym erhöhte sich das U_T/U_H -Verhältnis für die Bentonite und für Hydroxylapatit um den Faktor 7 bzw. 16.

Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der FTF und den Ionen der Trägerstruktur kann aktivierende bzw. stabilisierende Wirkung haben. Vermutlich koordinieren Fe-, Al- und Mg-Ionen im Bentonit bzw. Ca-Ionen im Hydroxylapatit die spezifische Anbindung der FTF über die Ca^{2+} -Bindedomäne. Versuche mit den freien Ionen haben gezeigt, dass sich mit Ca^{2+} 45 % und mit Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} 2 - 3 mal mehr Aktivität erzielen lässt. Bei der Reaktion in Gegenwart von Eisensalzen stieg die Transferaseaktivität um den Faktor 10 und erhöhte damit das U_T/U_H -Verhältnis um den Faktor 5 - 7,5.

Die Immobilisierung in einer quervernetzten Alginatmatrix führte zu einer Anreicherung der recFTF. Die Enzymreaktion fand primär an der Trägeroberfläche statt. Die recFTF kann im Alginat Ca^{2+} binden und wies neben der höheren spezifischen Aktivität analog zum Hydroxylapatit einen Transfructosylierungsanteil von 72 % auf.

Untersuchungen zur Adsorption während der Dialyse haben gezeigt, dass sich Bentonit aufgrund unspezifischer Adsorptionseffekte nicht für eine trägervermittelte Rückfaltung eignet. Dagegen wurde bei der Dialyse mit Hydroxylapatit aktives Enzym aus dem inclusion body-Resolubilisat gewonnen, welches zudem eine 10-fach höhere Aktivität als die Referenzprobe aufwies. Der agglomerierte Proteinanteil kann nicht vom Adsorbat abgetrennt werden und damit nicht einer weiteren Renaturierung zugeführt werden.

Die rekombinant produzierte β -Fructofuranosidase Suc1 wurde enzymkinetisch charakterisiert und zur Bildung neuartiger FOS eingesetzt. Für das 125 kDa große und stark glycosylierte Enzym wurde eine spezifische Enzymaktivität von 1685 U/mg_{Suc1} ermittelt. Die theoretisch errechnete Masse von 61,5 kDa konnte durch Deglycosylierung festgestellt werden. Die Suc1 hat ein hohes Temperaturoptimum von 50 - 55 °C und ein breites pH-Optimum bei pH 5 - 6. Bis ≤ 40 °C wurde keine thermische Denaturierung festgestellt. Eine Bestimmung des K_M nach Michaelis Menten war durch den sigmoidalen Kurvenverlauf nicht eindeutig. Die Kurve strebt einen Grenzwert von 35,0 mM/min für v_{\max} an, so dass näherungsweise ein K_M von etwa 250 mM bestimmt wurde. Die Suc1 zeigte mit steigenden Substratkonzentrationen eine deutliche Zunahme der Transfructosylierungsgeschwindigkeit. Durch den geringen Hydrolyseanteil von 5 - 10 % resultiert ein besonders hohes U_T/U_H -Verhältnis von 21.

Vorwiegend werden von der Suc1 nur kurzkettige Produkte mit maximal drei Fructosylresten gebildet, da die Reaktionsgeschwindigkeit nach der Bildung vom Trisaccharid stark abnimmt. Beim Einsatz der Saccharosederivate Man-Fru, Gal-Fru und Xyl-Fru entstehen Inulintyp-FOS mit unterschiedlichen Pyranosylköpfen. Die Substrat- und Akzeptorreaktionen zeigten Variationsmöglichkeiten für die C4 und C6 Gruppe des Pyranosylringes auf. Insgesamt ist eine zielgerichtete Synthese von neuartigen 1-Kestose und 1-Nystosederivaten in sehr hohen Ausbeuten möglich, wobei die hohe Substrat- und Akzeptorspezifität das Einsatzspektrum einschränkt.

7 Literaturverzeichnis

- Aalbæk, T., Reeslev, M., Jensen, B., Eriksen, S. H. Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. *Enz Microb Technol.* 2002; 30(3): 410–415.
- Abdel-Fattah, A. M., Gamal-Eldeen, A. M., Helmy, W. A., Esawy, M. A. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers*, 2012; 89(2): 314 - 322.
- Abdelmajeed, N. A., Khelil, O. A., Danial, E. N. Immobilization technology for enhancing bio-products industry. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11(71) :13528 - 13539.
- Adams, J. M. Synthetic Organic Chemistry Using Pillared, Cation-Exchanged and Acid-treated Montmorillonite Catalysts. *Appl Clay Sci.* 1987; 2: 309 - 342.
- Agostini, F., Vendruscolo, M., Tartaglia, G. G. Sequence-based prediction of protein solubility. *J Mol Biol.* 2012; 421(2-3): 237 - 41.
- Aich, U. und Yarena, K. J., *Glycobiology and Immunology, Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherpies*, Ed. Guo, Z. und Boons, G.-J., Wiley-VCH Verlag, 2009: 1 - 53.
- Altamirano, M.M., Garcia, C., Possani, L. D., Fersht, A. Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5, *Nature Biotechnol.* 1999; 17: 187 - 191.
- Alvaro-Benito, M., Sainz-Polo, M. A., Gonzalez-Perez, D., Gonzalez, B., Plou, F. J., Fernandez-Lobato, M., Sanz-Aparicio, J. Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis* β -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics. *J Biol Chem.* 2012; 287(23): 19674 - 86.
- Annunziata, A. und Vecchio, R. Functional foods development in the European market: A consumer perspective, *Journal of Functional Foods*, 2011; 3(3): 223 - 228.
- Antosova, M. und Polakovic, M. Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production of Fructooligosaccharides. *Chem Papers.* 2001; 55(6): 350 - 358.
- Anwar M. A., Kralj S., van der Maarel M. J., Dijkhuizen L. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(11): 3426 - 33.
- Anwar, M. A., Kralj, S., Pique, A. V., Leemhuis, H., van der Maarel, M. J., Dijkhuizen, L. Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products *Microbiology.* 2010; 156(4): 1264 - 1274.

- Anwar, M. A., Leemhuis, H., Pijning, T., Kralj, S., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L. The role of conserved inulosucrase residues in the reaction and product specificity of *Lactobacillus reuteri* inulosucrase. FEBS J. 2012; 279 (19): 3612 - 21.
- Apweiler, R., Hermjakoba, H., Sharonb, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta. 1999; 1473(1): 4 - 8.
- Ara, K., Ozaki, K., Nakamura, K., Yamane, K., Sekiguchi, J., Ogasawara, N. *Bacillus* minimum genome factory: effective utilization of microbial genome information. Biotechnol Appl Biochem. 2007; 46(3): 169 - 78.
- Arié, J. P., Miot, M., Sassoon, N., Betton, J. M. Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 2006; 62(2): 427-37.
- Arrhenius, S. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z Phys Chem. 1889; 4: 226 - 248.
- Asghera, M., Javaid Asada, M., Rahmanb, S. U. Leggec, R. L. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J Food Engin; 2007 79(3): 950 - 955.
- Atkins, P. W. und de Paula, J. Physikalische Chemie; Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 4. Auflage, 2010.
- Aust, E. und Bittner, B. Stöchiometrie - Chemisches Rechnen, Cicero-Verlag, Pegnitz, 4. Auflage, 2011.
- Avigad, G., Feingold, D. S., Hestrin, S. An enzymatic synthesis of a sucrose analog: α -D-xylopyranosyl- β -d-fructofuranoside. Biochim. Biophys. Acta. 1956; 20: 129 - 131.
- Baciu, I. E., Jördening, H.-J., Buchholz, K. Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside; J. Biotechnol. 2005; 116(4): 347 - 357.
- Baciu, I. E., Extracted sugar-beet pulp and sucrose, two renewable materials as "hot" substrates for enzymatic synthesis of valuable saccharides; Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2005.
- Bajpai, A. K. und Sachdeva, R. Study on the adsorption of hemoglobin onto bentonite clay surfaces. J Appl Polym Sci. 2002; 85(8): 1607 - 1618.
- Baneyx, F. und Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol. 2004; 22(11): 1399 - 1408.
- Barrer, R. M. Expanded clay minerals: a major class of molecular sieves. J incl phenom. 1986; 4(2): 109 - 119.

- Bartlett, G. J., Porter, C. T., Borkakoti, N., Thornton, J. M. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *J Mol Biol.* 2002; 324(1): 105 - 21.
- Basu, A., Li, X., Leong, S. S. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 92(2): 241 - 51.
- Batista, F. R., Hernandez, L., Fernandez, J. R., Arrieta, J., Menendez, C., Gomez, R., Tambara, Y., Pons, T. Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem. J.* 1999; 337: 503 - 506.
- Beine, R., Moraru, R., Nimtz, M., Na amnieh, S., Pawlowski, A., Buchholz, K., Seibel, J. Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering; *J. Biotechnol.* 2008; 138(1 - 2): 33 - 41.
- Beine, R. Alternative enzymatic methods for the glycosylation - bacterial sucrases with novel substrates. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2009.
- Beine, R., Valente, A. R., Biedendieck, R., Jahn, D., Seibel, J. Directed optimization of biocatalytic transglycosylation processes by the integration of genetic algorithms and fermentative approaches into a kinetic mode. *Process Biochem.* 2009; 44: 1103 - 1114.
- Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., Mejdoub, H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Int J Biol Macromol.* 2012; 50(2): 451 - 8.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamiura, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperatures. *J Biotechnol.* 2002; 99: 111 - 119.
- Benkert, P., Tosatto S. C. E., Schomburg D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 2008; 71(1): 261 - 277.
- Berges, T., Barreau, C., Peberdy, J. F., Boddy, L. M. Cloning of an *Aspergillus niger* invertase gene by expression in *Trichoderma reesei*. *Curr Genet.* 1993; 24(1 - 2): 53 - 9.
- Berthou, J. und Laurent, A. Crystallography of *Bacillus subtilis* levansucrase. *J of Mol Biol.* 1974; 82(1): 111 - 112.
- Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O., Heulin, T. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environ. Microbiol.* 2000; 2(3): 333 - 342.

- Biedendieck, R. *Bacillus megaterium*: Versatile tool for production, secretion and purification of recombinant proteins. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2007.
- Birkhed, D. Separation of "sucrases" in supernatants of human dental plaque material and characterisation of the reaction products. *Odontol Revy.* 1975; 26(3): 185 - 92.
- Blanco, R. M., Terreros, P., Fernández-Pérez, M., Otero, C. and Díaz-González, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. *J Mol Catal B: Enz.* 2004; 30, 83 - 93.
- BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) multiples Sequenzsalignment auf DNA- & Proteinebene, NCBI (National Center for Biotechnology Information), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Stand 11.2013)
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., Shao, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 1997; 277: 1453 - 1474.
- BMBF, Bundesministeriums für Bildung und Forschung, The German Biotechnology Sector. www.biotechnologie.de, 2013.
- Bohne-Lang A., von der Lieth C. W. GlyProt: in silico glycosylation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: 214 - 219.
- Boddy, L. M., Berges, T., Barreau, C., Vainstein, M.H., Dobson, M.J., Ballance, D. J., Peberdy, J. F. Purification and characterisation of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Curr Genet.* 1993; 24(1 - 2): 60 - 6.
- Booth, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev.* 1985; 49(4): 359 - 378.
- Bowden, G. A., Paredes, A. M., Georgiou, G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY).* 1991; 9(8): 725 - 30.
- Bratko, D., Blanch, H. W. The Effect of Secondary Structure on Protein Aggregation: A Replica Exchange Simulation Study. *J Chem. Phys.* 2003; 118 (11): 5185 - 5194.
- Brinkmann, U., Mattesa, R. E., Buckel, P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene.* 1989; 85: 109 - 114.
- Bronshteyn, M. und Steinberg, D. Immobilization of fructosyltransferase from *Streptococcus mutans* on hydroxyapatite surfaces induces the formation of multimeric complexes. *Lett Appl Microbiol.* 2002; 34(3): 205 - 9.
- Brown, A. J. Enzyme action. *J Chem Soc.* 1902; 81: 373 - 386.

- Brüx, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., Shoham, Y., Schomburg, D. The structure of an inverting GH43 beta-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its substrate reveals the role of the three catalytic residues. J Mol Biol. 2006; 359(1): 97 - 109.
- Brunauer, S., Emmett, P. H., Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. J Am Chem Soc. 1938; 60(2): 309 - 319.
- Buchholz, K. und Kasche, V. Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. Wiley-VCH-Verlag, 1997.
- Burhan, A., Nisa, U., Gokhan, C., Omer, C., Ashabil, A., Osman, G. Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. Process Biochem. 2003; 38: 1397 - 1403.
- Calamai, M., Canale, C., Relini, A., Stefani, M., Chiti, F., Dobson, C. M. Reversal of Protein Aggregation Provides Evidence for Multiple Aggregated States. J Mol Biol. 2005; 346(2): 603 - 616.
- Cao, L. Immobilised enzymes: science or art? Curr Opin Chem Biol. 2005; 9(2): 217 - 26.
- Capriles, V. D. und Areas, J. A. Effects of prebiotic inulin-type fructans on structure, quality, sensory acceptance and glycemic response of gluten-free breads. Food Funct. 2013; 4(1): 104 - 10.
- Caputi, L., Nepogodiev, S. A., Malnoy, M., Rejzek, M., Field, R. A., Benini, S. Biomolecular Characterization of the Levansucrase of *Erwinia amylovora*, a Promising Biocatalyst for the Synthesis of Fructooligosaccharides. J Agric Food Chem. 2013; E-Publikation.
- Caputto, R., Leloir, L. F., Cardini, C. E., Paladini, A. C. Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. J Biol Chem. 1950; 184(1): 333 -350.
- Carlson, M. und Botstein, D. Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. Mol Cell Biol. 1983; 3(3): 351 - 9.
- Carlson, J.D. und Yarmush, M.L. Antibody assisted protein refolding, BioTechnology. 1992; 10: 86 - 91.
- Carrio, M. M., Cubarsi, R., Villaverde, A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. FEBS Lett. 2000; 471(1): 7 - 11.
- Carrio, M. M. und Villaverde, A. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. J Bacteriol. 2005; 187, 3599 - 3601.
- CAZY (Carbohydrate Active EnZYmes -Datenbank) <http://www.cazy.org> (Stand 08.2014)
- Chambert, R., Treboul, G., Dedonder, R. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*; Eur. J. Biochem. 1974; 41(2): 285 - 300.

- Chambert, R. und Treboul, G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a stabilized fructosyl enzyme complex and identification of an aspartyl residue as the binding site of the fructosyl group. Eur J Biochem., 1976; 71(2): 493 - 508.
- Chambert, R., Benyahia, F., Petit-Glatron, M. F. Secretion of *Bacillus subtilis* levansucrase. Fe(III) could act as a cofactor in an efficient coupling of the folding and translocation processes. Biochem J. 1990; 265: 375 - 382.
- Chambert, R. und Petit-Glatron, M. F. Reversible thermal unfolding of *Bacillus subtilis* levansucrase is modulated by Fe^{3+} and Ca^{2+} . FEBS Lett. 1990; 275, 61 - 64.
- Chambert, R. und Petit-Glatron, M. F. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. Biochem. J. 1991; 279: 35 - 41.
- Chambert, R. und Petit-Glatron, M. F. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. Carbohydr Res. 1993; 244(1): 129 - 36.
- Cheetham, P. S. J., Hacking, A. J., Vlitos, M. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyltransferase from *Bacillus subtilis*. Enz Microb Technol. 1989; 11(4): 212 - 219.
- Chiang, C. J., Wang, J. Y., Chen, P. T., Chao, Y. P. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 82(3): 445 - 51.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. Biocatalysis: immobilized cells and enzymes. J Mol Catal. 1986; 37: 1 - 24.
- Christen, P. und Jaussi, R. Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005.
- Chuankhayan, P., Hsieh, C.-Y., Huang, Y.-C., Hsieh, Y.-Y., Guan, H.-H., Hsieh, Y.-C., Tien, Y.-C., Chen, C.-D., Chiang, C.-M., Chen, C.-J. Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. J Biol Chem. 2010; 285(30): 23251 - 64.
- Chmiel, H. Bioprozesstechnik, Edit. Chmiel, H., Spektrum Akademischer Verlag, 3. Aufl.; Heidelberg, 2011.
- Cirkovas, A., Sereikaite, J., Different effects of L-arginine on the heat-induced unfolding and aggregation of proteins, Biologicals. 2011; 39(3): 181 - 188.
- Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. Biochem Biophys Acta. 1963 a; 67: 104 - 137.

- Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: II. Inhibition: Nomenclature and theory. *Biochem Biophys Acta*. 1963 b; 67: 173 - 187.
- Cleland, W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochem. Biophys Acta*. 1963 c; 67: 188 - 196.
- ClustalW2 (EMBL-EBI basiertes multiples Sequenzalignment aus BLAST-Analysen) http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/ (Stand 11.2013)
- Codon Usage Database, <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (Stand 11.2013)
- Corchero, J. L. und Villaverde, A. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioengin.* 1998, 58(6): 625 - 632.
- Costa G. T., Guimaraes S. B., Sampaio H. A. Fructo-oligosaccharide effects on blood glucose: an overview. *Acta Cir Bras*. 2012;27(3):279 - 82.
- Cote, G. L. und Imam, S. H. Purification and properties of an extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Carbohydr. Res.* 1989; 190: 299 - 307.
- Coudray, C., Tressol, J. C. Gueux, E., Rayssiguier, Y. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *Eur J Nutr.* 2003; 42(2): 91 - 98.
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., Henrissat, B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol.* 2003; 328(2): 307 - 317.
- Cummings J. H., Macfarlane G. T., Englyst H. N. Prebiotic digestion and fermentation; *Am. J. Clin. Nutr. (Suppl.)*, 2001; 73: 415 - 420.
- Daguer, J. P., Chambert, R., Petit-Glatron, M. F. Increasing the stability of *sacB* transcript improves levansucrase production in *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol.* 2005; 41: 221 - 226.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Belghith, H., Mejdoub, H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *Int J Biol Macromol.* 2012; 51(3): 329 - 35.
- Daude D., Remaud-Simeon M., Andre I. Sucrose analogs: an attractive (bio)source for glycodiversification. *Nat Prod Rep.* 2012; 29(9): 945 - 60.
- Dauner, M., Storni, T., Sauer, U. *Bacillus subtilis* Metabolism and Energetics in Carbon-Limited and Excess-Carbon Chemostat Culture. *J Bacteriol.* 2001; 183(24): 7308 - 7317.

- Davies, G. J., Wilson, K. S., Henrissat, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 1997; 321: 557 - 59.
- De Abreu, M. A., Alvaro-Benito, M., Plou, F. J., Fernandez-Lobato, M., Alcalde, M. Screening β -fructofuranosidases mutant libraries to enhance the transglycosylation rates of β -(2 \rightarrow 6) fructooligosaccharides. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2011; 14(8): 730 - 8.
- De Araujo, A. C. Starch modification of the flocculation and flotation of apatite. PhD Thesis, The University of British Columbia, Vancouver, 1988.
- De Vuyst, L. und Degeest, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1999; 23(2): 153 - 77.
- Dedonder, R. Le levane-sucrase de *Bacillus subtilis*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1960; 42: 1745.
- Degering, C. Optimierung heterologer Proteinsekretion in *Bacillus* unter Verwendung wirtsfremder und künstlicher Signalpeptide. Dissertation, Universität Düsseldorf, 2010
- DeLange, R. J., Chang, J. Y., Shaper, J. H., Glazer, A. N. Amino acid sequence of flagellin of *Bacillus subtilis* 168. III. Tryptic peptides, N-bromosuccinimide peptides, and the complete amino acid sequence. *J Biol Chem.* 1976; 251(3): 705 - 11.
- Delfour, A. Approche tactique pour une analyse par spectroscopie de masse de la structure primaire des proteines: application a la levanesaccharase de *B. subtilis*. Dissertation. Universität Paris VII, 1981.
- Dellweg, H. Biotechnologie: Grundlagen und Verfahren, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994.
- Deng, Y., Zhu, Y., Wang, P., Zhu, L., Zheng, J., Li, R., Ruan, L., Peng, D., Sun, M. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSn5, an endophytic bacterium of *Amorphophallus konjac* with antimicrobial activity to plant pathogen *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *J Bacteriol.* 2011; 193: 2070 - 2071.
- Dixon, D. A. Porewater salinity and the development of swelling pressure in bentonite-based buffer and backfill materials. Posiva Report; Atomic Energy of Canada Ltd., 2000.
- Dobson, C. M. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 329 - 332.
- Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature.* 2003; 426(6968): 884 - 890.
- Dörfler, H. D. Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie, 1. Auflage, Springer Verlag, 2002.
- Dogsa, I., Brloznik, M., Stopar, D., Mandic-Mulec, I. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLoS One.* 2013; 8(4): e62044.

- Dominguez-Vergara, A. M., Vazquez-Moreno, L. und Montfort, G. R. Role of prebiotic oligosaccharides in prevention of gastrointestinal infections: a review. *Arch Latinoam Nutr.* 2009; 59(4): 358 - 68.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., Glick, B. R. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol.* 1996; 16: 145 - 154.
- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P., Wittmann, C. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 87(6): 2011-24.
- Dubeya, A. K., Suresha, C., Kavitha, R., Karanthb, N. G., Umesh-Kumar, S. Evidence that the glucoamylases and α -amylase secreted by *Aspergillus niger* are proteolytically processed products of a precursor enzyme. *FEBS Lett.* 2000; 471(2 - 3): 251 - 255.
- Dustmann, H. Analyse und Evaluierung der Auswirkungen des Angebots und der Nachfrage nach funktionellen Lebensmitteln auf die Ernährungsindustrie sowie auf vor- und nachgelagerte Stufen der Wertschöpfungskette. Dissertation, Technische Universität München, 2004.
- Earl, A. M., Eppinger, M., Fricke, W. F., Rosovitz, M. J., Rasko, D. A., Daugherty, S., Losick, R., Kolter, R., Ravel, J. Whole-Genome Sequences of *Bacillus subtilis* and Close Relatives. *J Bacteriol.* 2012; 194: 2378 - 2379.
- Earley, J. W., Milne, I. H. McVeagh, W. J. Thermal, dehydration and X-ray studies on montmorillonite. Gulf Research and Development Company Report, Miner Soc Am. 1953; 770 - 783.
- Edman, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 1949; Band 22: 475.
- Eiswirth, M. und Schwankner, R. Modellvorstellungen zur Adsorption. *Praxis der Naturwissenschaften Chemie.* 1989; 38(1): 363 - 367.
- El-Refai, H. A., Abdel-Fattah, A. F., Mostafa, F.A. Immobilization and properties of *Bacillus circulans* levansucrase. *Acta Pharm. Sci.* 2009 a; 51: 149 - 156.
- El-Refai, H. A., Abdel-Fattah, A. F., Mostafa, F. A. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World J of Microb and Biotechnol.* 2009 b; 25(5):821 - 827.
- Erhardt, F. A. Tailor-made biocatalysts for integrated adsorption and synthesis of saccharides in a multiphase reactor. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2008.

- Erickson, H. P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Onl.* 2009; 11(1): 32-51.
- Esawy, M., Mahmoud, D., Fattah, A. Immobilisation of *Bacillus subtilis* NRC33a levansucrase and some studies on its properties. *Braz. J. Chem. Eng.* 2008; 25: 237 - 246.
- Euzenat, O., Guiberta, A., Combes, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. 1997; 32(3): 237 - 243.
- Fang, Y., Huang, X.-J., Chen, P.-C., Xu, Z.-K. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. *BMB Rep.* 2011; 44(2): 87 - 95.
- FASTA heuristische Ähnlichkeitssuche von DNA- und Proteinsequenzen, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/> (Stand 11.2013)
- Feingold, D. S., Avigad, G, Hestrin, S. Enzymatic synthesis and reactions of sucrose isomer α -D-galactopyranosyl- β -D-fructofuranoside. *J. Biol. Chem.* 1957; 224: 295 - 307.
- Fenoglio, I., Fubini, B., Ghibaudi, E. M., Turci, F. Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(13): 1186 - 209.
- Fernandez, R. C., Ottoni, C. A., da Silva, E. S., Matsubara, R. M., Carter, J. M., Magossi, L.R., Wada, M. A., de Andrade Rodrigues, M. F., Maresma, B. G., Maiorano, A. E. Screening of beta-fructofuranosidase-producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 75(1): 87 - 93.
- Fernandez-Arrojo, L., Rodriguez-Colinas, B., Gutierrez-Alonso, P., Fernandez-Lobato, M., Alcalde, M., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. *Process Biochem.* 2013. 48(4): 677 - 82.
- USDA, United States Department of Agriculture (Foreign Agricultural Service). Sugar: World Markets and Trade. 2013.
- Freundlich, H. Über die Adsorption in Lösungen. *Z Phys Chem.* 1907; 57: 385 - 470.
- Gabrielczyk, J. Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der Fructosyltransferase SacB aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 sowie die Immobilisierung mittels Physisorption. Bericht Forschungspraktikum, Technische Universität Braunschweig, 2011.
- Gabrielczyk, J. Aufarbeitung, Charakterisierung und Immobilisierung einer Fructosyltransferase für den technischen Einsatz. Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2012.
- Garcia-Fruitos, E., Gonzalez-Montalban, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Aris, A., Ventura, S., Villaverde, A. Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb Cell Fact.* 2005; 4: 27.

- Garcia-Fruitos, E., Aris, A., Villaverde, A. Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(1): 289 - 94.
- Frumkin, A. Electrocapillary Curve of Higher Aliphatic Acids and the State Equation of the Surface Layer. *Z Phys Chem.* 1925; 116: 466 - 484.
- Gautam, S., Dubey, P., Rather, G. M., Gupta, M. N. Non-chromatographic strategies for protein refolding. *Recent Pat Biotechnol.* 2012; 6(1): 57 - 68.
- Gay, P., Cordier, P., Marquet, M., Delobbe, A. Carbohydrate metabolism and transport in *Bacillus subtilis*. *Molec gen Genet.* 1973; 121: 355 - 368.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J.A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. *J Bacteriol.* 1983; 153: 1424 - 1431.
- GeoDataZone, Dreischichtminerale, <http://www.geodsz.com> (Stand 12.2013).
- Georgiou, G. und Valax, P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Op in Biotechnol.* 1996; 7 (2): 190 - 197
- Gey, M. H. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen, Springer Verlag 2008.
- Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem.* 2011; 113(3): 236 - 47.
- Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A., Plou, F. J. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *J Biotechnol.* 2007; 128(1): 204 - 211.
- Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., Sedaghat, M. E. Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Appl Clay Sci.* 2009; 43(3 - 4), 289 - 295.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., Cummings, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 1995; 108: 975 - 982
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics; *J. Nutr.*; 1995, 125(6), 1401 - 1412.
- Gölker, C. F. Aufarbeitung in der Biotechnologie. Handbuch der Biotechnologie. Oldenbourg Verlag GmbH München, 1994.
- Goetz, R. M. und Fuglsang, A. Correlation of codon bias measures with mRNA levels: analysis of transcriptome data from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 327(1): 4 - 7.

- Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Shoham, G., Danino, D., Shoham, Y. J. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase: an ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. *Biol. Chem.* 2008; 283: 32209 - 32217.
- Goosen, C., Yuan, X. L., van Munster, J.M., Ram, A. F., van der Maarel M.J., Dijkhuizen, L. Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(4): 674 - 81.
- Gouy, M. und Gaultier, C. Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* 1982; 10: 7055 - 7074.
- Gavrilescu, M. und Chisti, Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv.* 2005; 23(7 - 8): 471 - 499.
- Greenland, D. J. The adsorption of sugars by montmorillonite. X-ray studies. *J Soil Sci.* 1956; 7(2): 319 - 28.
- Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Munch, R., Nortemann, B., Hempel, D. C., Jahn, D. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: W526 - 31.
- Grundy, F. J., Waters, D. A., Takova, T. Y., Henkin, T. M. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 1993; 10(2): 259 - 271.
- Günata, Z. und Vallier, M.-J. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. *Biotechnol Lett.* 1999; 21: 219 - 223.
- Guo, C., Li, Z., Shi, Y., Xu, M., Wise, J. G., Trommer, W.E., Yuan, J. Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin. *Protein Expr Purif.* 2004; 37(2): 361 - 7.
- Gutierrez-Alonso, P., Fernandez-Arrojo, L., Plou, F. J., and Fernandez-Lobato, M. Biochemical characterization of a beta-fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis* with transfructosylating activity. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9: 768 - 773.
- Han Y.W. Microbial levan. *Adv Appl Microbiol.* 1990; 35: 171 - 94.
- Harms, K., De Vries, J., Wackernagel, W. A double kill gene cassette for the positive selection of transforming non-selective DNA segments in *Acinetobacter baylyi* BD413. *J Microbiol Meth.* 2007; 69: 107 - 115.
- Hartley, B. S. und Kilby B. A. The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochem J.*, 1954; 56(2): 288 - 97.
- Hartley, D. L. und Kane, J. F. Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans.* 1988; 16: 101 - 102.

- Hartmeier, W. Immobilisierte Biokatalysatoren - auf dem Weg zur zweiten Generation; Naturwissensch. 1985; 72(6): 310 - 314.
- Hartmeier, W. Immobilisierte Biokatalysatoren: eine Einführung. 1. Aufl., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1986.
- Hashimoto, K., Madej, T., Bryant, S. H., Panchenko A. R. Functional states of homooligomers: insights from the evolution of glycosyltransferases. J Mol Biol. 2010; 399(1): 196 - 206.
- Haupt, B. Immobilisation von Enzymen auf sphärischen Polyelektrolytbürsten. Dissertation, Universität Bayreuth, 2005.
- Herfurth, T. Prozessoptimierung zur Herstellung und Aufreinigung der rekombinanten Fructosyltransferase SacB aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871. Bachelorarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2012.
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. Biochem J. 1995; 309: 113 - 118.
- Hestrin, S., Avineri-Shapiro, S., Aschner, M. The enzymic production of levan. Biochem J. 1943; 37(4): 450 - 456.
- Hestrin, S. und Avineri-Shapiro, S. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Biochem J. 1944; 38(1): 2 - 10.
- Hestrin, S. und Avigad, D. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 5. Transfer of fructose to C-1 of aldose by levansucrase; Biochem. J. 1958; 69: 388 - 398.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J Bacteriol. 1995; 177(10): 2834 - 2839.
- Hidaka, H., Hirayama, M., Sumi, N. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 1988; 52: 1181 - 1187.
- Hirayama, M., Sumi, N., Hidaka, H. Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing beta-fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric Biol Chem. 1989; 53: 667 - 673.
- Hirose, I., Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K., Yamane, K. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. Microbiol. 2000; 146 (1): 65 - 75

- Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Bio/Technology* 1988; 6 (11): 1321 - 1325.
- Hoffmann, G. F. und Grau A. J. Stoffwechselerkrankungen in der Neurologie, Georg Thieme Verlag, 2004.
- Holzer, L., Münch, B., Rizzi, M., Wepf, R., Marschall, P. & Graule, T. 3Dmicrostructure analysis of hydrated bentonite with cryo-stabilized porewater. *Appl Clay Sci.* 2010; 47(3 - 4): 330 - 342.
- Homann, A. Kinetische Untersuchungen zur Akzeptorspezifität der Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871. Studienarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2005.
- Homann, A. Charakterisierung einer Fructosyltransferase aus *Bacillus megaterium* und deren Varianten. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2006
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., Seibel, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 2007; 407: 189 - 198.
- Homann, A. En route to tailor-made oligosaccharides - chemo-enzymatic synthesis and physiological functions of novel carbohydrate structures. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2009.
- Homann, A. und Seibel, J. Chemo-enzymatic synthesis and functional analysis of natural and modified glycostructures. *Nat Prod Rep.* 2009; 26(12): 1555 - 71.
- Homann, A., Timm, M., Seibel, J. Chemo-enzymatic synthesis and in vitro cytokine profiling of tailor-made oligofructosides. *BMC Biotechnol.* 2012; 12(1): 90.
- Hortsch, R. und Weuster-Botz, D. Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 90(1): 69 - 76.
- Hsu, C.-K., Liao, J.-W., Chung, Y.-C., Hsieh, C.-P., Chan, Y.-C. Xylooligosaccharides and Fructooligosaccharides Affect the Intestinal Microbiota and Precancerous Colonic Lesion Development in Rats. *J Nutr.* 2004; 134(6): 1523 - 8.
- Hughes Wassell, D. T., Hall, R. C., Embery, G. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials.* 1995; 16(9): 697 - 702.
- Hullo, M. F., Moszer, I., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. CotA of *Bacillus subtilis* Is a Copper-Dependent Laccase. *J Bacteriol.* 2001; 183(18): 5426 - 5430.
- Inthanavong, L. Production and Characterization of the Fructosyltransferase (Levansucrase) from *Geobacillus stearothermophilus* and its Application for the Synthesis of Novel Fructooligosaccharides. Dissertation, McGill University, 2011.

- Inthanavong, L., Tian, F., Khodadadi, M., Karboune, S. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Biotechnol Prog.* 2013, E-Publikation.
- Invernizzi, G., Papaleo, E., Sabate, R., Ventura, S. Protein aggregation: mechanisms and functional consequences. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44(9): 1541 - 54.
- Ilzuka, M., Yamaguchi, H., Ono, S., Minamiura, N. Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support SM-10. *Biosci Biotech Biochem.* 1993; 57(2): 322 - 324.
- Jana, S. und Deb J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 67(3): 289 - 98.
- Jang, E. K., Kim, C. H., Kim, K. H., Kim, S. H. Complete nucleotide sequence of sacN, levansucrase (sacN) gene, in *Bacillus subtilis* (natto). 09.2002 in EMBL/GenBank/DDBJ Database implementiert.
- Jang, K. H., Song, K. B., Kim, J. S., Kim, C. H., Chung, B. H., Rhee, S. K. Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite. *Bioproc Eng.* 2000; 23(1): 89 - 93.
- Jayasuriya, G.C.N. The isolation and characteristics of an oxalate-decomposing organism. *J Gen Microbiol.* 1955; 12: 419 - 428.
- Jensen, E. B. und Carlsen, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnol Bioeng.* 1990; 36(1): 1 - 11.
- Jeron, A. Prozessoptimierung zur batchweisen Herstellung einer extrazellulären Fructosyltransferase aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871, Studienarbeit, Technische Universität Braunschweig, 2004.
- Jovanović, N. und Janačković, J. Pore structure and adsorption properties of an acid-activated bentonite. *Appl Clay Sci.* 1991; 6(1): 59 - 68.
- Jungbauer, A. und Kaar, W. Current status of technical protein refolding. *J Biotechnol.* 2007; 128(3): 587 - 596.
- Kainz, E., Gallmetzer, A., Hatzl, C., Kainz, E., Gallmetzer, A., Hatzl, C., Nett, J. H., Li, H., Schinko, T., Pachlinger, R., Berger, H., Reyes-Dominguez, Y., Bernreiter, A., Gerngross, T., Wildt, S., Strauss, J. N-glycan modification in *Aspergillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(4): 1076 - 86.
- Kaldenhoff, R. und Richter, G. *Praktische Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart (2003)
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., Day, D. F., Robyt, J. F. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1727: 5 - 15.

- Kang, S. A., Jang, K.-H., Seo, J.-W., Kim, K. H., Kim, Y. H., Rairakhwada, D., Seo, M. Y., Lee, J. O., Ha, S. D., Kim, C. H., Rhee, S.-K. Levan: applications and perspectives. In Production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. Editor Rehm BHA, New Zealand: Caister Academic Press, 2009.
- Kaur N. und Gupta A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. J Biosci.; 2002, 27(7):703 - 14.
- Kawasaki, T., Takahashi, S., Ideda, K. Hydroxyapatite high-performance liquid chromatography: column performance for proteins. Eur J Biochem 1985; 152 (2):361–371.
- Kelly, G. Inulin-type prebiotics: a review (Teil 2). Altern Med Rev. 2009; 14: 36 - 55.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., Buchner, J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. BioTechnol. 1991; 9: 825 - 829.
- Klein, J., Stock, J., Vorlop, K.-D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. Eur J appl microbiol biotechnol. 1983; 18(2): 86 - 91.
- Koch, A. L. The kinetics of mycelial growth. J Gen Microbiol. 1975; 89(2): 209-16.
- Koch, V. Empirische Analyse zur Ermittlung der Verbraucherakzeptanz einer Functional Food-Innovation, Diplomarbeit, Technische Universität München, 2010.
- Kono, T., Yamaguchi, G., Hidaka, H. Fructose transferring enzyme absorbed on a granular carrier for production of fructooligosaccharides. Patent US 5314810A, 1994; Meiji Seika Kaisha, Japan.
- Krahl, M. Funktionelle Getränke auf Basis vermälzter Zerealien und Pseudozerealien, Dissertation, Technische Universität München, 2010.
- Kraut, J. Serine Proteases: Structure and Mechanism of Catalysis. Annu Rev Biochem. 1977; 46: 331 - 58.
- Krüger, M. K., Pedersen, S., Hagervall, T. G., Sorensen, M. A. The modification of the wobble base of tRNA^{Glu} modulates the translation rate of glutamic acid codons *in vivo*. J Mol Biol. 1998; 284: 621 - 631.
- Kunst, F., Steinmetz, M., Lepesant, J. A., Dedonder, R. Presence of a third sucrose hydrolyzing enzyme in *Bacillus subtilis*: constitutive levanase synthesis by mutants of *Bacillus subtilis* Marburg 168. Biochimie. 1977; 59 (3): 287 - 292.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., *et.al*. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. 1997; 390(6657): 249 - 256.

- Kurakake, M., Masumoto, R., Maguma, K., Kamata, A., Saito, E., Ukita, N., Komaki, T. Production of fructooligosaccharides by beta-fructofuranosidases from *Aspergillus oryzae* KB. J Agric Food Chem. 2010; 58(1): 488 - 92.
- L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., Xu, S. Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. J Biotechnol. 2000; 81(1): 73 - 84.
- Lafraya, A., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J., Marin-Navarro, J. Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(17): 6148 - 57.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., Withers, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. Ann Rev Biochem. 2008; 77: 521 - 555.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., van den Ende, W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. J Exp Bot. 2009; 60(3): 727 - 40.
- Langmuir, I. Surface Chemistry. Nobel Lecture, 14. Dez. 1932, In: Nobel Lectures, Chemistry 1922 - 1941, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966 (Quelle: nobelprize.org)
- Langmuir, I. Surface Chemistry. Chem Rev. 1933; 13(2): 147 - 191.
- Lasch, J. Enzymkinetik - Eine Einführung für Biochemiker, Mediziner, Biologen, Chemiker und Pharmazeuten, Springer-Verlag, 1987.
- Laskowski, J. S., Liu, Q., O'Connor, C. T. Current understanding of the mechanism of polysaccharide adsorption at the mineral/aqueous solution interface. Int J Miner Process. 2007; 84: 59 - 68.
- Le Brun, E. und Van Rapenbusch, R. The structure of *B. subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. J Biol Chem. 1980; 255: 12034 - 12036.
- Le Traon-Masson, M. - P. und Pellerin, P. Purification and Characterization of Two β -d-Glucosidases from an *Aspergillus Niger* Enzyme Preparation: Affinity and Specificity Toward Glucosylated Compounds Characteristic of the Processing of Fruits. Enz Microb Technol. 1998; 22(5): 374 - 382.
- Leloir L. F. Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. Science. 1971; 172(3990): 1299 - 303.
- Leloup, L., Haddaoui, El-A., Chambert, R., Petit-Glatron, M. F. Characterization of the rate-limiting step of the secretion of *Bacillus subtilis* alpha-amylase overproduced during the exponential phase of growth. Microbiol. 1997; 143(10): 3295 - 303.

- Leloup, L., Le Saux, J., Petit-Glatron, M. F., Chambert, R. Kinetics of the secretion of *Bacillus subtilis* levanase overproduced during the exponential phase of growth. Microbiol. 1999; 145(3): 613 - 9.
- Leong, S. S. J. und Middelberg, A. P. J. Dilution versus dialysis: a quantitative study of the oxidative refolding of recombinant human alpha-fetoprotein. Food Bioprod Process. 2006; 84(1 C): 9 - 17.
- Lepeniev, B., Yin, J., Seeberger, P. H. Applications of synthetic carbohydrates to chemical biology. Curr Opin Chem Biol. 2010; 14(3): 404 - 11.
- Li, M., Su, Z.-G., Janson, J.-C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. Protein Express Purif. 2004; 33(1): 1 - 10.
- Li, T., Wang, N., Li, S., Zhao, Q., Guo, M., Zhang, C. Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. Biotechnol Lett. 2007; 29(9): 1413 - 6.
- Lichtenthaler, F. W. Carbohydrates as Organic Raw Materials, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag, 2010: 583 - 612.
- Lim, S., Lee, K. Y., Lee, Y.-B., Song, K.-B. Immobilization of levan fructotransferase for the production of di-fructose anhydride from levan. Biotechnol Lett. 2001; 23(16): 1335 - 1339.
- Lin, T.-J. und Lee, Y.-C. High-content fructooligosaccharides production using two immobilized microorganisms in an internal-loop airlift bioreactor. J Chin Inst Chem Eng. 2008; 39(3): 211 - 217.
- Lis H. und Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur J Biochem. 1993; 218(1):1 - 27.
- Liu, Q., Zhang, Y., Laskowski, J. S. The adsorption of polysaccharides onto mineral surfaces: an acid/base interaction. Int J Miner Process. 2000; 60, 229 - 245.
- Luedeking, R. und Piret, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. J Biochem Microbiol Technol Eng. 1959; 1: 393 - 412.
- Mabel, M. J., Sangeetha, P. T., Platel, K., Srinivasan, K., Prapulla, S. G. Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetics. Carbohydr. Res. 2008; 343(1): 56 - 66.
- Mäntsälä, P. und Puntala, M. Comparison of levansucrase from *Bacillus subtilis* and from *Bacillus amyloliquefaciens*. FEMS Microbiol. Lett. 1982; 13: 395 - 399.
- Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Am Soc Microbiol. 1996; 60(3): 512 - 38
- MAPP Conference, Functional Foods - Historical development of concept and industry. Tage Affertshold, Aarhus School of Business, NL-Aarhus, 13.11.2008

- Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D., Bayer, K. Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *J Biotechnol.* 2008; 138(3 - 4): 67 - 73.
- Martin, I., Debarbouille, M., Ferrari, E., Klier, A., Rapoport, G. Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase. *Mol Gen Genet.* 1987; 208 (1 - 2): 177 - 184.
- Martin, I., Debarbouille, M., Klier, A., Rapoport, G. Induction and metabolite regulation of levanase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1989; 171 (4): 1885 - 1892.
- Martinsen, A., Storrø, I., Skjærk-Bræk, G. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnol Bioeng.* 1992; 39(2): 186–194.
- Martinez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E.J., Arrieta, J. G., Hernandez, L., Davies, G. J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J.* 2005; 390: 19 - 27.
- Martinez-Martinez, I., Kaiser, C., Rohde, A., Ellert, A., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A., Luttmann, R. High-Level Production of *Bacillus subtilis* Glycine Oxidase by Fed-Batch Cultivation of Recombinant *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *Biotechnol Prog.* 2007; 23: 645 - 651.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enz Microb Technol.* 2007; 40(6): 1451 - 1463.
- Mattern, I. E., van Noort, J. M., van den Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N., van den Hondel, C. A. Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol Gen Genet.* 1992; 234(2): 332 - 336.
- McCleary, B. V. und Harrington, J. Purification of beta-D-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Methods Enzymol.* 1988; 160: 575-583.
- McCluskey K., The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol.* 2003; 52: 245 - 62.
- Menart, V., Gaberc-Porekar, V., Javsevar, S. Process for the production of increased amounts of correctly folded Heterologous protein in inclusion bodies. Patent: EP1527188B1, 2010; LEK Pharmaceuticals D.D., Slowenien.
- MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), Software Tool, <http://www.megasoftware.net/> (Version 5.1, Stand 2012)
- Meng, F., Park, Y., Zhou, H. Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(7): 701 - 9.

- Meng, G. und Fütterer, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. Nat Struct Biol. 2003; 10: 935 - 941.
- Meng, G. und Fütterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. BMC Struct Biol. 2008; 8:16.
- Michaelis, L. und Menten M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung; Biochem. Z. 1913; 49: 333 - 369.
- Middelberg, A. P. Preparative protein refolding. Trends Biotechnol. 2002; 20(10):437 - 43.
- Mielenz, R. C., Cyril Schieltz, N., King, M. E. Thermogravimetric analysis of clay and clay-like minerals. Clay Clay Miner. 1953; 2: 285-314.
- Misawa, S. und Kumagai, I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies, Biopolymers. 1999; 51: 297 - 307.
- Mitraki, A. und King, J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. Bio/Technology. 1989; 7: 690 - 697.
- Monod, J. The growth of bacterial cultures. Annual Rev Microbiol. 1949; 3: 371 - 394.
- Morales-Arrieta, S., Rodriguez, M. E., Segovia, L., Lopez-Munguia, A., Olvera-Carranza, C. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. Gene. 2006; 376: 59 - 67.
- Moraru, R. T. Novel enzymatic and chemical pathways towards fructooligosaccharide and glycopeptide synthesis. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2006.
- Mukherjee, S., Babitzke, P., Kearns, D. B. FliW and FliS function independently to control cytoplasmic flagellin levels in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2013; 195(2): 297 - 306.
- Nakada, T., Chaen, H., Sugimoto, T. Beta-Fructofuranosidase, seine Herstellung und Verwendungen. Patent: EP 0780470. 2001; Okayama-shi, Japan.
- Nakakuki, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. Pure Appl. Chem., 2002; 74 (7), 1245 - 1251
- Nakamura, T., Ogata, Y., Kamo, Y., Hirayama, M., Ohta, K. Inulo-Oligosaccharides: Continuous Production from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger* and in vitro Utilization by *Bifidobacteria*. Food Sci. Technol. Res.; 2001 7(2): 145 - 148.
- Nakapong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M., Pongsawasdi, P. High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. Int J Biol Macromol. 2013; 54: 30 - 6.

- Naumov, G. I. und Naumova, E. S. Comparative genetics of yeasts: a novel beta-fructosidase gene SUC8 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika*. 2010; 46(3): 364 - 72.
- Nguyen, Q. D. Rezessy-Szabó, J. M. Bhatb, M. K., Hoschke, Á. Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. *Process Biochem*. 2005; 40(7): 2461 - 66.
- Nishito, Y., Osana, Y., Hachiya, T., Pendorf, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Itaya, M., Sakakibara, Y. Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis natto* from very short read data. *BMC Genom*. 2010, 11: 243.
- Nowikow, K. Adsorption von Modellproteinen an Bentonit und der Einsatz eines adsorptiven Verfahrens für die Enzymanreicherung aus Zuckerrüben, Dissertation, Technische Universität Braunschweig 1995.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development, Future Prospects for Industrial Biotechnology, OECD Publishing, 2011.
- Oh, J.-T. und Kim, J.-H. Preparation and properties of immobilized amyloglucosidase on nonporous PS/PNaSS microspheres. *Enzyme Microb. Technol*. 2000; 27(6): 356 - 361.
- Ohtake, S., Kita, Y., Arakawa, T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63(13): 1053 - 73.
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Osawa, O., Kanematsu, T., Uchida, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Biosci Biotech Biochem*. 1992; 56: 1373 - 1377.
- Olivares-Illana, V., Wachter-Odarte, C., Le Borgne, S., Lopez-Munguia, A. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microb Biotechnol*. 2002; 28: 112 - 117.
- Olivares-Illana, V., Lopez-Munguia, A., Olvera, C. Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *J. Bacteriol*. 2003; 185(12): 3606 - 3612.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudino-Pinera, E., Olvera, C., Lopez-Munguia, A. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng. Des. Sel*. 2008; 21: 589 - 595.
- Ortiz-Soto, M. E., Rudiño-Piñera, E., Rodriguez-Alegria, M. E., Munguia, A. L. Evaluation of cross-linked aggregates from purified *Bacillus subtilis* levansucrase mutants for transfructosylation reactions. *BMC Biotechnol*. 2009; 9:68: 1 - 8.

- Osborn, H. M. I., Evans, P. G., Gemmell, N., Osborne, S. D. Carbohydrate-based therapeutics. *J. Pharmacy. Pharmacol.* 2004; 56(6): 691 - 702.
- Ozimek, L. K., Euverink, G. J., van der Maarel, M. J., Dijkhuizen, L. Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett.* 2005; 579: 1124 - 1128.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J., Dijkhuizen, L. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.* 2006; 152(4): 1187 - 96.
- Palmer, I. und Wingfield, P. T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* 2012; Chapter 6 (6.3).
- Parfitt, R. L. und Greenland, D. J. Adsorption of polysaccharides by montmorillonite. *Soil Sci Soc Amer J.* 1970; 34(6): 862 - 866.
- Park, Y. K. und Almeida, M. M. Production of fructooligosaccharides from sucrose by a transfructosylase from *Aspergillus niger*. *World J Microbiol Biotechnol.* 1991; 7: 331 - 34.
- Park, J., Kim, M.-I., Park, Y.-D., Shin, I., Cha, J., Kim, C. H., Rhee, S. Structural and functional basis for substrate specificity and catalysis of levan fructotransferase. *J Biol Chem.* 2012; 287(37): 31233 - 41.
- Parnell J. A. und Reimer R. A. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(6):1751 - 9.
- Patskovsky, Y., Almo S. C., Burley, S. K. Crystal structure of beta-1,4-xylosidase from *Bacillus subtilis*. 2005; PDB-Code: 1YIF.
- PDB (Protein Database) RCSB-Datenbank für Strukturdaten von Proteinen und Nukleinsäuren, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Stand 11.2013).
- Peri, F. Clustered carbohydrates in synthetic vaccines. *Chem Soc Rev.* 2012.
- Perlot, P. und Monsan, P. Production, purification and immobilization of *Bacillus subtilis* levansucrase. *Ann NY Acad Sci.* 1984; 434(7): 468 - 471.
- Petit-Glatron, M. F., Chambert, R., Steinmetz, M. Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a form isolated from phenol-treated cells and activated by Triton X-100. *Eur J Biochem.* 1980, 103(1): 189 - 195.
- Petit-Glatron, M. F., Monteil, I., Benyahia, F., Chambert, R. *Bacillus subtilis* levansucrase: amino acid substitutions at one site affect secretion efficiency and refolding kinetics mediated by metals. *Mol Microbiol.* 1990; 4: 2063 - 2070.

- Petit-Glatron M. F. und Chambert, R. Peptide carrier potentiality of *Bacillus subtilis* levansucrase. J Gen Microbiol. 1992; 138(6): 1089 - 95.
- Pohl, W. Petraschecks Lagerstättenlehre - Eine Einführung in die Wissenschaft von den mineralischen Bodenschätzen. 4. Auflage, 1992.
- Pons T, Naumoff D. G, Martinez-Fleites C, Hernandez L. Three acidic residues are at the active site of beta-propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. Proteins. 2004; 54: 424 - 432.
- Prestidge, L. S. und Spizizen, J. Inducible Sucrase Activity in *Bacillus subtilis* Distinct from Levan-sucrase. Microbiol. 1969; 59(2): 285 - 288.
- ProtParam, Berechnung von physikalischen und chemischen Parametern von Proteinen <http://web.expasy.org/protparam/> (Stand 03.2014).
- Przybycien, T. M., Dunn, J. P., Valax, P., Georgiou, G. Secondary structure characterization of β -lactamase inclusion bodies. Protein Eng. 1993; 7(1): 131-136.
- Rairakhwada, D., Seo, J.-W., Seo, M.-Y., Kwon, O., Rhee, S.-K., Kim C. H. Gene cloning, characterization, and heterologous expression of levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010; 37: 195 - 204.
- Raju, G. B., Holmgren, A., Forsling, W. Complexation mechanism of dextrin with metal hydroxides. J Colloid Interface Sci. 1998; 200, 1 - 6.
- Ramirez, D. M. und Bentley, W. E. Characterization of stress and protein turnover from protein overexpression in fed-batch *E. coli* cultures. J Biotechnol. 1999; 71(1 - 3): 39 - 58.
- Rastall R. A. Functional oligosaccharides: application and manufacture. Annu Rev Food Sci Technol. 2010; 1: 305 - 39.
- Rathbone, E. B., Hacking, A. J., Cheetham, P. S. J. Process for the preparation of fructosyl disaccharides. Patent: US 4617269. 1986; Tate And Lyle Public Limited Company, Groß Britannien.
- Remaud-Simeon, M., Lopez-Munguia, A., Pelenc, V., Paul, F., Monsan, P. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing alpha-(1-2) linkages. Appl Biochem Biotechnol. 1994; 44(2): 101 - 17.
- Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H. D., Korz, D., Sanders, E. A., Ross, A., Deckwer, W. D. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. J Biotechnol. 1991; 20(1): 17 - 27.
- Riesenberg, D. und Guthke, R. High cell density cultivation of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 1999; 51: 422 - 30.

- Riesenman, P. J. und Nicholson, W. L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66:620 - 626.
- Roberfroid, M. B. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.*, 2007; 137, 830S - 37S
- Roberfroid M. B. und Delzenne N. M. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr.* 1998; 18:117 - 43.
- Roberfroid, M. U., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Meheust, A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits., *Br J Nutr.* 2010; 104 (2): 1 - 63.
- Robinson, B. P. Ion-Exchange Minerals and Disposal of Radioactive Wastes - A Survey of Literature, Geological Survey Water-Supply Paper, 1962
- Rogolsky, M. Genetic mapping of a locus which regulates the production of pigment associated with spores of *Bacillus subtilis*. *J bacteriol.* 1968; 95(6): 2426 - 2427.
- Rølla, G., Ciardi, J. E., Eggen, K. H., Bowen, W. H., Afseth, J. Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth in vivo. S. 21-30; in *Glucosyltransferases, Glucans, Sucrose and Dental Caries*. 1. Auflage, Oxford University Press, Washington D.C., 1983.
- Roth, A. H. und Dersch, P. A novel expression system for intracellular production and purification of recombinant affinity-tagged proteins in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 86(2): 659 - 70.
- Roush, D. J. und Lu, Y. Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. *Biotechnol Prog.* 2008; 24(3): 488 - 95.
- Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., Steinberg, D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 195: 205 - 210.
- Rozen, R., Bachrach, G., Zaks, B., Bronshteyn, M., Gedalia, I., Steinberg, D. Effect of chlorhexidine on molecular weight distribution of fructans produced by fructosyltransferase in solution and immobilized on surface. *Carbohydr Res.* 2003; 338(6): 571 - 5.
- Rubio, M. C. und Maldonado, M. C. Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Curr Microbiol.* 1995; 31: 80 - 83.
- Rudolph, R. und Lilie, H. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 1996; 10(1): 49 - 56.

- Rüther, U. pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucleic Acids Res.* 1982; 10, 5765 - 5772.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Sánchez, O. F., Rodríguez, A. M. Silva, E., Caicedo, L. A. Sucrose Biotransformation to Fructooligosaccharides by *Aspergillus sp.* N74 Free Cells. *Food Bioprocess Technol.* 2010; 3(5): 662 - 673.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; 65(5): 530 - 537.
- Sawicki, E. und Sawicki, C. R. *Aldehydes. Photometric Analysis Vol. 3*, Academic Press London, 1976.
- Scheffer, F und Schachtschabel, P. *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 15. Auflage, 2002.
- Schein, C. H. und Noteborn, M. H. M. Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia coli* is Favored by Lower Growth Temperature. *Nat Biotechnol.* 1988; 6: 291 - 294.
- Schlegel, H. G. *Allgemeine Mikrobiologie*. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B., Bühler, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13(4): 359 - 366.
- Schyns, G., Lapointe, T., Serra, C., Potot, S., Fickers, P., Wyss, M., Pereira-Leal, J., Perkins, J., Henriques, A. Genome sequence of an undomesticated *Bacillus subtilis* strain isolated from organic farm poultry faeces. 06.2012 in EMBL/GenBank/DDBJ Database implementiert.
- Seeberger, P. H. und Werz D. B. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. *Nature*, 2007; 446: 1046 - 1051
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S. Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues; *Tetrahedron*. 2005; 61: 7081 - 7086.
- Seibel, J., Jördening, H.-J., Buchholz, K. Glycosylation with activated sugars using glycosyltransferases and transglycosidases. *Biocat Biotrans.* 2006 a, 24(5): 311 - 342.
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A., Hecht, H.-J. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase); *Carbohydr Res.* 2006 b; 341(14): 2335 - 2349.

- Seidle, H. F., Marten, I., Shoseyov, O., Huber, R. E. Physical and kinetic properties of the family 3 beta-glucosidase from *Aspergillus niger* which is important for cellulose breakdown. *Protein J.* 2004; 23(1): 11 - 23.
- Sharp, P. M. und Li, W. H. The codon Adaptation Index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* 1987; 15: 1281 - 1295.
- Shi, Y., Jiang, C., Chen, Q., Tang, H. One-step on-column affinity refolding purification and functional analysis of recombinant human VDAC1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 303: 475 - 482.
- Shiloach, J. und Fass, R. Growing *E. coli* to high cell density - a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv.* 2005; 23(5): 345 - 57.
- Singh, S. M. und Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosc Bioengin.* 2005; 99(4): 303 - 310.
- Singh, S. M., Upadhyay, A. K., Panda, A. K. Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. *J Chem Techn Biotechnol.* 2008; 83(8): 1126 - 1134.
- Silva, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(3): 691 - 708.
- Siró, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. *Appetite.* 2008; 51(3): 456 - 67.
- Skerra, A., Schmidt, T. G. M. Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 2000; 326A, 271 - 304.
- Slivinski, C. T., Lopes Machado, A. V., Iulek, J., Ayub, R. A., Mendes de Almeida, M. Biochemical characterisation of a glucoamylase from *Aspergillus niger* produced by solid-state fermentation. *Braz arch biol technol.* 2011; 54(3): 559 - 568.
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., Slonczewski, J. L. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of rpoS and growth pH. *J Bacteriol.* 1994; 176(6): 1729 - 37.
- Smidsrød, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Disc Chem Soc.* 1974; 57: 263 - 274.
- Smidsrød, O. und Skjåk-Bræk, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends biotechnol.* 1990; 8: 71 - 78.
- Song, D. D. und Jacques, N. A. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J.* 1999 a; 341: 285 - 291.

- Song, D. D. und Jacques, N. A. Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J.* 1999 b; 344(1): 259 - 264.
- Sorensen, M. A., Kurland, C. G., Pedersen, S. Codon usage determine translation rate in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1989; 207: 365 - 377.
- Straathof, A. J., Kieboom, A. P., van Bekkum, H. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. *Carbohydr Res.* 1986; 146(1): 154 - 9.
- Strandberg, L. und Enfors, S. O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(6): 1669 - 74.
- Steinberg, D., Bachrach, G., Gedalia, I., Abu-Ata, S., Rozen, R., Effects of various antiplaque agents on fructosyltransferase activity in solution and immobilized onto hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(5): 374 - 9.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Ben Djemia, H., Gay, P. Analyse genetique de sacB, gene de structure d une enzyme secrete, la levane-saccharase de *B. subtilis*. *Mol Gen Genet.* 1983; 191: 138 - 144.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymeric, S., Gonzy-Trboul, G., Gay P. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet.* 1985; 200: 220 - 228.
- Stoll, V. und Blanchard, J. Buffers: principles and practice. *Meth Enzymol.* 1990; 182: 24 - 38.
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., Heinz, D.W. Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J Biol Chem.* 2011; 286(20): 17593 - 600.
- Stülke, J. und Hillen, W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus species*. *Ann Rev of Microbiol.* 2000; 54: 849 - 880
- Sudarsanam, P., Ley, R., Guruge, J., Turnbaugh, P. J., Mahowald, M., Liep, D., Gordon, J. Draft genome sequence of *Clostridium ramosum* (DSM 1402). 11.2007 a in EMBL/GenBank/DDBJ Database implementiert.
- Sudarsanam, P., Ley, R., Guruge, J., Turnbaugh, P. J., Mahowald, M., Liep, D., Gordon, J. Draft genome sequence of *Clostridium boltea* (ATCC BAA-613). 09.2007 b in EMBL/GenBank/DDBJ Database implementiert.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986; 189(1): 113 - 30.
- Suzuki, T., Yamane, T., Shimizu, S. Phenomenological background and some preliminary trials of automated substrate supply in pH-stat modal fed-batch culture using a setpoint of high limit. *J Ferm Bioeng.* 1990; 69(5): 292 - 297.

- Szwengiel, A., Czarnecka, M., Czarnecki, Z. Levan synthesis during associated action of levansucrase and *Candida cacaoi* DSM 2226 yeast. *Pol J Food Nutr Sci.* 2007; 57, 433 - 440.
- Tanaka, H., Matsumura, M., Veliky, I. A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng.* 1984; 26: 53 - 58.
- Tang, M. L. Probiotics and prebiotics: immunological and clinical effects in allergic disease. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* 2009; 64: 219 - 35.
- Taniguchi, H. Carbohydrate Research and Industry in Japan and the Japanese Society of Applied Glycoscience, *Starch*, 2004; 56(1): 1 - 5.
- Tardioli, P. W., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Giordano, R. L. C. Design of New Immobilized-Stabilized Carboxypeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. *Biotechnol. Progr.* 2003; 19(2):565 - 574.
- Taylor, M. J. und Richardson, T. Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. *Adv Appl Microbiol.* 1979; 25: 7 - 35.
- Taylor, G., Hoare, M., Gray, D. R., Marston, F. A. O. Size and Density of Protein Inclusion Bodies. *Nat Biotech.* 1986; 4(6): 553 - 557.
- Temkin, M. I. Adsorption equilibrium and the kinetics of processes on heterogenous surfaces and during reaction between the adsorbed molecules. *Zh Fiz Khim.* 1941; 15(3): 296 - 332.
- Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2006; 72: 211 - 222.
- Thomas, J. G., Ayling, A., Baneyx, F. Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*: To Fold or to Refold. *Appl Biochem. Biotechnol. - Part A. Enz Engin Biotechnol.* 1997; 66(3): 197 - 238.
- Tian, F. und Karboune, S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. *J Mol Catal B.* 2012; 82: 71–79.
- Tieking, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., Gänzle, M. G. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 66: 655 - 663.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D. H., Bron, S., Maarten van Dijk, J., Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64(3): 515 - 547.
- Tripathi, N. K., Sathyaseelan, K., Jana, A. M., Rao, P. V. L. High Yield Production of Heterologous Proteins with *Escherichia coli*. *Def Sci J.* 2009; 59(2): 137 - 146.

- Tsai, L. B., Lu, H. S., Kenney, W. C., Curless, C. C., Klein, M. L., Lai, P. H., Fenton, D. M., Altrock, B. W., Mann, M. B. Control of misincorporation of de novo synthesized norleucine into recombinant interleukin-2 in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 156(2): 733 - 9.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif*. 2003; 28(1): 1 - 8.
- Tsutomu, A. und Kouhei, T. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation *Biochem Biophys Res Com*. 2003; 304(1): 148 -152.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., Arakawa, T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Progress*. 2004; 20(5): 1301 - 1308.
- UniProt, Blast-Analyse Proteindatenbank, <http://www.uniprot.org/> (Stand 11.2013)
- USITC, U.S. International Trade Commission, Industrial Biotechnology: Development and Adoption by the U.S. Chemical and Biofuel Industries. Publikation 4020, 2008.
- Vacca Smith, A. M. und Bowen, W. H. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol*. 2000; 45: 277 - 291.
- Valax, P. und Georgiou, G. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli* 1. Composition. *Biotechnol Prog*. 1993; 9: 539 - 547.
- van den Berg, B. A., Reinders, M. J., Hulsman, M., Wu, L., Pel, H. J., Roubos, J. A., de Ridder, D. Exploring sequence characteristics related to high-level production of secreted proteins in *Aspergillus niger*. *PLoS One*. 2012; 7(10): e45869.
- van den Ende, W., Lammens, W., van Laere, A., Schroeve, L., Le Roy, K. Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes. *FEBS J*. 2009; 276(20): 5788 - 98.
- van Hijum, S. A. F. T., van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., van der Maarel, M. J., Dijkhuizen, L. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002; 68(9): 4390 - 4398.
- van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 2004; 150: 621 - 630.
- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K. D., Dijkhuizen, L., und van Geel-Schutten, I. G. H. Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006; 70(1): 157 - 176.

- van Reis, R. und Zydney, A. Membrane separations in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; 12(2): 208 - 11.
- Vaidya, V. und Prasad, D. T. Thermostable levansucrase from *Bacillus subtilis* BB04, an isolate of banana peel. *J Biochem Tech.* 2012; 3(4).
- Valax, P., und Georgiou, G. Molecular characterization of beta-lactamase inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 1993; 9(5): 539 - 47.
- Vallejo, L. F. und Rinas, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact.* 2004; 3: 11.
- Vanková, K., Antosová, M., Polakovic, M. Adsorption equilibrium of fructosyltransferase on a weak anion-exchange resin. *J Chromatogr A.* 2007; 1162(1): 56 - 61.
- Ventura, S. und Villaverde, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* 2006; 24(4): 179 - 85.
- Wahlgren, M. und Arnebrant, T. Protein adsorption to solid surfaces. *Trends Biotechnol.* 1991; 9(1): 201 - 208.
- Waldherr, F.W., Meissner, D., Vogel, R. F. Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Arch. Microbiol.* 2008; 190: 497 - 505.
- Wallis, G. L., Hemming, F. W., Peberdy, J. F. Secretion of two beta-fructofuranosidases by *Aspergillus niger* growing in sucrose. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 345(2): 214 - 22.
- Wanker, E., Huber, A., Schwab, H. Purification and characterization of the *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 1953 - 1958.
- Weickmann, H. Hybridnanopartikel und polymere Nanokomposite auf Basis von Bentonit und armierten Polymerlatizes. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, 2005.
- Weissberg, H.L. Effective diffusion coefficient in porous media. *J Appl Phys.* 1963; 34(9): 2636 - 2639.
- Weissenborn, P. K., Warren, L. J., Dunn, J. G. Selective flocculation of ultrafine iron ore. Mechanism of adsorption of starch onto hematite. *Colloids Surf.* 1995; A 99, 11 - 27.
- Weisz, P. B. und Prater, C. D.: Interpretation of measurements in experimental catalysis. *Adv Catal.* 1954; 6: 143 - 196.
- Willis, M. S., Hogan, J. K., Prabhakar, P., Liu, X., Tsai, K., Wei, Y., Fox, T. Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: a study of reagent effects and interactions. *Protein Sci.* 2005; 14(7): 1818 - 26.
- Wilson, K. und Goulding, K. H., Methoden der Biochemie, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 1991.

- Win, T. T., Isono, N., Kusnadi, Y., Watanabe, K., Obae, K., Ito, H., Matsui, H. Enzymatic synthesis of two novel non-reducing oligosaccharides using transfructosylation activity with beta-fructofuranosidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biotechnol Lett.* 2004; 26(6): 499 - 503.
- Wollenberger, U., Renneberg, R., Bier, F. F., Scheller, F. W. Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen. 1. Auflage, Wiley-VCH, 2012.
- Wong, C. H., The Scripps Research Institute, <http://www.scripps.edu/wong/PIX/sugar.jpg>, 2012
- Worrall, D. M. und Goss, N. H. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Aust J Biotechnol.* 1989; 3(1): 28 - 32.
- Wu, W., Xing, L., Zhou, B., Lin, Z. Active protein aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2011; 15: 10 - 19.
- Wu, X., Jornvall, H., Berndt, K. D., Oppermann, U. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313: 89 - 96.
- Wu, X. und Narsimhan, G. Effect of surface concentration on secondary and tertiary conformational changes of lysozyme adsorbed on silica nanoparticles. *Biophys Acta Prot Proteom.* 2008; (1784): 1694 - 1701.
- Xu, J., Zhou, Q., Ma, Z., Yu, J., Hua, M., Ding, R. Study on construction of His6-human TNFb fusion expression plasmid and single-step purification of its product, *Pharm. Biotechnol.* 2000; 7: 1 - 5.
- Yamamoto, S., Iizuka, M., Tanaka, T., Yamamoto, T. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Agric Biol Chem.* 1985; 49, 343 - 349.
- Yamashita K., Kawai K., Itakura M. Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr Res.* 1984; 4:961 - 6.
- Yanai, K., Nakane, A., Kawate, A., Hirayama, M. Molecular cloning and characterization of the fructooligosaccharide-producing beta-fructofuranosidase gene from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65(4): 766 - 73.
- Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., Kato, N., Tonomura, K. Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992; 56: 1335 - 1337.
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., Okamoto, K. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J. Biochem.* 2002; 132: 565 - 572.

- Yao, J., Tjandra, W., Chen, Y. Z., Tam, K. C., Ma, J., Soh, B. Hydroxyapatite nanostructure material derived using cationic surfactant as a template. *J Mater Chem.* 2003; 13: 3053-3057.
- Yeo, I.C., Lee, N. K., Hahm, Y.T. Genome sequencing of *Bacillus subtilis* SC-8, antagonistic to the *Bacillus cereus* group, isolated from traditional Korean fermented-soybean food. *J Bacteriol.* 2012; 194: 536 - 537.
- Yikrazuul (Michaelis-Menten_plot.svg); <http://de.wikipedia.org/wiki/Enzym> (Stand 10.2013).
- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H., Fujii, T. Multiple beta-fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 265(2): 159 - 63.
- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H., Fujii, T. Purification and some properties of beta-fructofuranosidase I formed by *Aureobasidium pullulans* DSM 2404. *J Biosci Bioeng.* 2007; 103(5): 491 - 3.
- Yu, C.-S., Yim, K.-Y., Tsui, S. K.-W., Chan, T.-F. Complete Genome Sequence of *Bacillus subtilis* Strain QB928, a Strain Widely Used in *B. subtilis* Genetic Studies. *J Bacteriol.* 2012; 194: 6308 - 6309.
- Yun, J.W. Fructooligosaccharides. Occurrence: preparation and application. *Enzyme Microb Technol.* 1996; 19: 107 - 117.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R., Jänicke, R. Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. I. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry.* 1979; 18: 5567 - 5571.
- Zhang, Y., Shen, Y. L., Xia, X. X., Sun, A. Y., Wei, D. Z., Zhou, J. S., Zhang, G. J., Wang, L. H., Jiao, B. H. High-cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for production of TRAIL by using a 2-stage feeding strategy. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2004; 20(3): 408 - 13.
- Zwerenz, A. Produktion hochwertiger Oligosaccharide aus nachwachsenden Rohstoffen, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 2012.
- Zuccaro, A., Götze, S., Kneip, S., Dersch, P., Seibel, J. Tailor-made fructooligosaccharides by a combination of substrate and genetic engineering. *Chem Bio Chem.* 2008; 9(1): 143 - 149.

8 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen

°C	Grad Celsius	Da	Dalton
A	Adenin; enzymatische Aktivität	DC	Dünnschichtchromatographie
A.	<i>Aspergillus</i>	DEAE	Diethylaminoethyl
Ab _λ	Absorption gemessen bei Wellenlänge λ in nm	DL	Durchlauf
Abb.	Abbildung	DMSO	Dimethylsulfoxid
abs.	absolut	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ak	Akzeptor	DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
Al	Aluminium	<i>Dr.rer.nat.</i>	<i>doctor rerum naturalium</i> , Doktor der Naturwissenschaften
Amp	Ampicillin	DTT	Dithiothreitol
Anh.	Anhang	<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	E	Enzym, Envelope, Eluat
AS	Aminosäure(n)	E _λ	Extinktion
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>	EC	Enzyme Commission, Enzymklasse
B	Batchkultivierung, Bentonit	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BET	Brunauer Emmett Teller	EMBL	European Molecular Biology Laboratory
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>	EPS	Exopolysaccharide
bp	Basenpaar(e)	ESI	Elektrospray Ionisierung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung	<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> , und andere
BSA	Rinderserumalbumin	<i>etc.</i>	<i>et cetera</i> , und so weiter
BTM	Biotrockenmasse	EU	Europäische Union
bzw.	beziehungsweise	ES	Enzym-Substrat-Komplex
C	Cytosin, Kohlenstoff, Chair	F, Fru	Fructose
c	Konzentration	Fa.	Firma
Ca	Calcium	FASTA	heuristischer FASTA-Algorithmus
ca.	circa	Fe	Eisen
CAI	Codon Adaption Index	FOS	Fructooligosaccharide
CAM	Chloramphenicol	FOSHU	Food for specific health use
CAZY	Carbohydrate-Active enZymes	FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
CBM	Carbohydrate Bioengineering Meeting	<i>ff</i>	Gen der Fructosyltransferase
CIP	Cleaning in place	FTF	Fructosyltransferase
CLEAs	carrier-bound cross-linked enzyme aggregates	Fuc	Fucose
Cr	Chrom	fwd	forward, (5' → 3')
d.h.	das heißt	g	Gramm, Gravitationskonstante

G	Guanin		natürlicher Logarithmus
Gal	Galactose	LP	Lysepuffer
Gal-Fru	Galactosylfructosid	LS	Levansucrase
GalNAc	N-Acetylgalactosamin	μ	Mikro (10^{-6})
GC	Gaschromatographie	m	Meter, Milli (10^{-3})
GH	Glycosidhydrolase	M	Molar (mol/l), Mega (10^6), Marker
Gl.	Gleichung	Mal	Maltose
Glu	Glucose	MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
Glu-Fru	Glucosylfructosid, Saccharose		
GluNAc	N-Acetylglucosamin	Man	Mannose
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	Man-Fru	Mannosylfructosid
GRAS	Generally recognized as safe	MAPP	Market-Based Process and Product Development in the Food Sector
GT	Glycosyltransferase	MCS	multiple cloning site
gtf	Gen der Glucosyltransferase	MDP	mittlerer Partikeldurchmesser
Gtf	Glucosyltransferase	Mg	Magnesium
h	Stunde	Milli-Q	Laborreinstwasser
HA	Hydroxylapatit	min	Minute
His	Histidin, Histidin-Tag	Mn	Mangan
HPAEC	High Performance Anionen-Exchange Chromatographie	MO	Mikroorganismus
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie	mol	Mol
I	Inhibitor	Mrd.	Milliarden
IB	inclusion body, Einschlusskörper	mRNA	messenger Ribonukleinsäurestrang
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie	MS	Massenspektrometrie
Ig	Immunglobulin	MW	Molekulargewicht
Inst.	Institut	MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid	n	nano (10^{-9}), Anzahl / Einheiten
IR	Infrarot	N	Norm, Stickstoff
JCat	Java Codon Adaption Tool	NaAc	Natriumacetat
K	Kalium, Kontrolle, Referenz	n.b.	nicht bestimmt
Kan	Kanamycin	NCBI	National Center for Biotechnology Information
kb	Kilobasen	NCIMB	National Collection of Industrial and Marine Bacteria
l	Liter	n.d.	nicht detektiert
L.	<i>Lactobacillus</i>	NEB	New England Biolabs
Lac	Lactose	neg	negativ
LB	Luria-Bertani	n.m.	nicht messbar
Lev	Levan	NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz
IF	lösliche Fraktion	Nr	Nummer
ln	<i>logarithmus naturalis</i> ,		

NTA	Nitrilotriessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
O	Sauerstoff, Oktaederschicht	SEC	Größenausschlusschromatographie
OECD	Organisation for Economic Co- Operation and Development	sek	Sekunden
OD _λ	Optische Dichte gemessen bei Wellenlänge λ in nm	Si	Silicium
OH	Hydroxyl, Hydroxid	s.o.	siehe oben
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserasterrahmen	sog.	sogenannt
OS	Oligosaccharide	sp.	Spezies
p	Pico (10 ⁻¹²)	SPase	Signalpeptidase
P	Produkt, Puffer	ST	Standard
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Strep	Streptavidin, Streptavidin-Tag
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion	s.u.	siehe unten
PDB	Protein Data Bank	susp.	suspendiert
PES	Polyethersulfon	T	Thymin, Temperatur, Twist, Tetraederschicht
PEG	Polyethylenglycol	Tab.	Tabelle
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
pl	Isoelektrischer Punkt	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck	term	terminate
PP	Phosphatpuffer	Tet	Tertracyclin
Prof.	Professor	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
pts	phosphotransferase system	Triton X100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
PVDF	Polyvinylidendifluorid	tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
R ²	Regressionskoeffizient	TU	Technische Universität
rec	rekombinant	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
RI	Brechungsindex	UDP	Uridindiphosphat
RF	<i>ratio of fronts</i> ; Substanzlängfen	Ü, ÜS	Überstand
RNA	Ribonukleinsäure	uF	unlösliche Fraktion
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute	US	Ultraschall
rS	rekombinanter Stamm	USA	United States of America
RSCB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics	USDA	United States Department of Agriculture
RT	Raumtemperatur	USITC	United States International Trade Commission
rv	reverse, (3' → 5')	UV	Ultraviolette Licht
s.(a.)	siehe (auch)	V	Volt, Volumen, Version
S.	<i>Streptococcus</i>	var.	variabel
S	Schüttelkolbenkultivierung, Substrat	vgl.	vergleiche
Sac	Saccharose	Vol.	Volumen
		vs.	<i>versus</i> , gegen(übergestellt)
		vvm	Volumenverhältnis des Gasdurch- satzes (Gas/Flüssigkeit je min)

v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit	Xyl	Xylose
W	Waschfraktion	Xyl-Fru	Xylosylfructosid
wt	Wildtyp	z.B.	zum Beispiel
w/v	Masseneinheit pro Volumeneinheit	ZE	Zellextrakt
w/w	Masseneinheit pro Masseneinheit	Zn	Zink

Verwendete Messgrößen

A	[1/s]	präexponentieller Faktor: Arrhenius-Gesetz
c	[g/l, mM]	Konzentration
d	[m]	Durchmesser, Schichtdicke
D_0	[m ² /s]	Diffusionskoeffizient
E_a	[kJ/mol]	Aktivierungsenergie
ΔG	[kJ/mol]	Gibbs-Energie, freie Enthalpie
k	[1/(M · s)]	Geschwindigkeitskonstante
k_{cat}	[1/s]	Katalytische Konstante
k_i	[1/h]	Inaktivierungsrate
K_F	[-]	Freundlich-Adsorptionskoeffizient
K_I	[mM]	Inhibierungskonstante
K_L	[-]	Langmuir-Adsorptionskoeffizient
K_M	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante
K_S	[g/l]	substratspezifische Konstante nach Monod
M	[g/mol]	molare Masse
M_R	[Da]	Molekulare Masse in Dalton
m	[g]	Masse
n	[mol]	Stoffmenge
p	[Pa]	Druck
pO_2	[Pa]	Sauerstoffpartialdruck
q_i	[mg _{Protein} /mg _{Adsorbens}] [U/mg _{Adsorbens}]	Beladung des Adsorbens
$q_3(x)$	[1/ μ m]	Verteilungsdichte
$Q_3(x)$	[%]	Verteilungssumme
R	[J/(K · mol)]	Gaskonstante
S	[-]	Selektivität
T	[°C, K]	Temperatur
t	[min, h]	Zeit
$t_{1/2}$	[min]	Halbwertszeit
v	[mM/min]	Reaktions-/Umsatzgeschwindigkeit
X	[%]	Umsatz
x	[μ m]	Partikelgröße
x_{50}	[μ m]	Median der Verteilungssumme $Q_3(x)$
Y	[%]	Ausbeute
z_i	[-]	Anzahl elektrischer Ladungen

Griechische Formelzeichen

Δ	[-]	Differenz
δ	[-]	Konstriktivität
ε	[-]	Porosität, Extinktionskoeffizient
μ	[h ⁻¹]	spezifische Wachstumsrate
κ	[g/ml]	Dichte
τ	[-]	Tortuosität
η	[-]	Porennutzungsgrad
Φ	[-]	Thiele-Modul
ϑ	[-]	Stöchiometrischer Faktor
ψ	[-]	Weisz-Modul

Indices

0	Anfang, initial	k	Eduktkomponente
A	Akzeptor	L	Lysozym
Ads	Adsorbens	max	Maximum
ads	adsorbiert	opt	Optimum
B	Batch	p	Partikel, Produkt
D	Donor, DNase	PI	Produktinhibition
eff	effektiv	Poly	Polymerisierung
eq	Equilibrium, im Gleichgewicht	renat	renaturiert
frei	gelöst, frei	SI	Substratüberschussinhibition
H	Hydrolyse	sol	solubilisiert
i	Inhibition, Anzahl	T	Transfructosylierung
imm	immobilisiert	vol	volumetrisch
ini	initial		

Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamat	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.1: molekulare Zellerkennung membranassoziierter Kohlenhydrate.....	4
Abb. 2.2.1: Weltweiter Absatzmarkt für Functional Food.	8
Abb. 2.2.2: Entwicklung des Marktvolumens von FOS-Produkten in Japan von 1997 bis 2007 und Entwicklung des Weltmarktvolumens.....	8
Abb. 2.2.3: Oligosaccharidproduktion in Japan.....	9
Abb. 2.4.1: Reaktionsweg von Leloir- und Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen zur Bildung des glycosylierten Akzeptormoleküls mittels nukleotidaktiverter Glucose bzw. Saccharose als Substrat	11
Abb. 2.4.2: A: Struktur Levan, B: Struktur Inulin.....	12
Abb. 2.4.3: Reaktionen der Levansucrase.....	14
Abb. 2.4.4: Transfructosylierungsmechanismus für die Levansucrase aus <i>Bacillus subtilis</i> : a) Saccharosebindung im aktiven Zentrum; b) Ausbildung eines Oxocarbenium-Ions; c) kovalenter Enzym-Fructosyl-Komplex; d) Bildung des Akzeptorproduktes.....	16
Abb. 2.4.5: lineare Darstellung der Struktur(elemente) der Levansucrase SacB aus <i>Bacillus subtilis</i>	17
Abb. 2.4.6: A: räumliche Struktur; B: aktives Zentrum der Levansucrase SacB aus <i>Bacillus subtilis</i>	18
Abb. 2.4.7: Invertasestruktur: A: N- und C-Domäne, katalytische Triade der AuLFTase aus <i>Arthrobacter ureafaciens</i> ; B: aktives Zentrum des AuLFTase(D54N)-Saccharose-Komplexes.....	19
Abb. 2.4.8: Saccharoseanaloga aus der Akzeptorreaktion der Levansucrase aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871 mit D-/L-Monosaccharidakzeptoren.....	22
Abb. 2.4.9: Akzeptorreaktion der Levansucrase aus <i>Bacillus subtilis</i>	22
Abb. 2.5.1: $v/[S]$ -Diagramm einer enzymatischen Michaelis-Menten-Kinetik.....	24
Abb. 2.6.1: Zwei-Substrat-Kinetikmodelle.	24
Abb. 2.6.2: Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus für die Levansucrase.	25
Abb. 2.7.1: pH-Abhängigkeit einer Enzymreaktion.....	26
Abb. 2.7.2: Temperaturabhängigkeit einer Enzymreaktion.	27
Abb. 2.8.1: Prozessstrukturierung zur Entwicklung und Optimierung intra- und extrazellulär produzierter Biokatalysatoren.....	30
Abb. 2.8.2: Wachstumskurve von Bakterienkulturen.....	31
Abb. 2.9.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Escherichia coli</i> mit cytosolischen inclusion bodies.....	34
Abb. 2.11.1: Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren.....	39
Abb. 2.11.2: räumliche Darstellung der Bentonit-Schichtstruktur.	43

Abb. 2.11.3: elektrostatische Wechselwirkungen von Hydroxylapatit.....	44
Abb. 4.2.1: 3D-Struktur Fructosyltransferase SacB aus <i>Bacillus subtilis</i> mit gebundenem Raffinosemolekül	50
Abb. 4.2.2: AS-Sequenz der rec FTF _{His} (p24FTF) inkl. sec-Signalsequenz und Spacer mit His6-Tag.....	50
Abb. 4.2.3: AS-Sequenz der recFTF _{Strep} (pASK-IBA63bFTF) inkl. Spacer mit Strep-Tag.....	51
Abb. 4.2.4: Suc1: 3D-Struktur nach SWISS-Mode (<i>in silico</i>)	51
Abb. 4.2.5: Suc1: 3D-Struktur nach GlyProt (<i>in silico</i>).....	51
Abb. 4.2.6: AS-Sequenz der Suc1 aus <i>Aspergillus niger</i>	52
Abb. 4.2.7: A: Expressionsvektor pET-24(+); B: Expressionsvektor pASK-IBA63b+; C: Co-Plasmid pRARE aus <i>E. coli</i> Rosetta	
Abb. 4.3.1: DNA Größenstandards	59
Abb. 4.5.1: Schematische Darstellung der Querstromfiltration.....	66
Abb. 4.5.2: Proteinmarker und Proteingrößenstandards	72
Abb. 4.6.1: Photometrischer Nachweis von Aldehyden.....	74
Abb. 4.8.1: Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871 (B1 - B4).....	81
Abb. 4.8.2: schematische Darstellung des Einzelfermenters	81
Abb. 4.11.1: Immobilisierungsapparat für den Matriceinschluss mit Alginat.....	87
Abb. 4.11.2: Versuch zur Adsorption der recFTF _{Strep} während der FTF-Renaturierung.....	88
Abb. 5.1.1: Pigmentierung der Schüttelkolbenkultur nach 26 h Kultivierung.	91
Abb. 5.1.2: Zellmorphologie in Abhängigkeit vom Kultivierungs-pH-Wert.....	92
Abb. 5.1.3: Kultivierungen mit verschiedenen pH-Werten (S1 - S6). A: Biotrockenmasse; B: Proteinkonzentration.....	93
Abb. 5.1.4: Kultivierung mit 10,0 und 20,0 g/l Saccharose bzw. mit 0,5 und 1,0 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ (S7-S9). A: Biotrockenmasse; B: Proteinkonzentration	94
Abb. 5.1.5: Verlauf von Biotrockenmasse, Gesamtprotein im Kulturüberstand, relative Sauerstoffsättigung und Korrekturmittelverbrauch (2,5 M NaOH) für die Bioreaktorkultivierung (B1 - B4).....	96
Abb. 5.1.6: Aktivität der Kulturüberstände.....	98
Abb. 5.3.1: SDS-Gel vom Kulturüberstand nach 26 h mit identifizierten und nichtidentifizierten Proteinbanden.....	100
Abb. 5.3.2: phylogenetische Abstammung der AS-Sequenz von der gereiften SacB (<i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871).	102
Abb. 5.4.1: Restriktionsanalyse von p24-Bs. NCIMB 11871 und p24-Bs.168 mittels NdeI/XhoI und EcoRI/HindIII.....	105
Abb. 5.4.2: Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21 von der rekombinanten His-Tag-Variante SacB und der FTF (recFTF _{His}).	105
Abb. 5.4.3: Restriktionsanalyse von pASK-IBA63b+ Bs. NCIMB 11871 mittels NcoI/XhoI.	107
Abb. 5.4.4: Proteinexpression in <i>E. coli</i> Rosetta von der rekombinanten FTF-Strep-Tag Variante (recFTF _{Strep}).....	108

Abb. 5.4.5:	Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von der recFTF _{Strep} mit den statistischen Aminosäureverteilungen codierender Sequenzen der Wirtsorganismen <i>E. coli</i> K12 und <i>B. subtilis</i> 168.....	109
Abb. 5.4.6:	FLPC-Aufreinigung recFTF _{His} und Konzentrierung mittels Amicon® Ultra	110
Abb. 5.4.7:	Affinitätschromatographische Aufreinigung der recFTF _{Strep}	111
Abb. 5.4.8:	Aufreinigungsprozess von recFTF _{Strep} inclusion bodies. A: SDS-Gel; B: solubilisierte inclusion bodies vor der Dialyse (IB _{sol}); C: Enzymlösung nach der Dialyse (IB _{renat}).....	113
Abb. 5.4.9:	Renaturierungsausbeuten von recFTF _{Strep} in Abhängigkeit von der Konzentration solubilisierter inclusion bodies.	114
Abb. 5.4.10:	Abhängigkeit zwischen IB-recFTF-Aktivität und Enzymkonzentration: A: Ultrafiltration zur Konzentrierung der renaturierten recFTF _{Strep} ; B: Vergleich der Konzentrierungen renaturierter recFTF _{Strep} aus verschiedenen Kultivierungen bis zur Löslichkeitsgrenze.	115
Abb. 5.4.11:	Zeitliche Entwicklung der OD ₆₀₀ und BTM für <i>E. coli</i> Rosetta recFTF _{Strep} bei der Schüttelkolbenkultivierung mit 28 °C und 37 °C.....	118
Abb. 5.4.12:	Proteinkonzentration und FTF-Aktivität nach der Induktion bei 28 °C und 37 °C. A: Zellysatüberstand; B: inclusion bodies.....	118
Abb. 5.4.13:	Zeitliche Entwicklung der OD ₆₀₀ und BTM für <i>E. coli</i> Rosetta recFTF _{Strep} bei der Bioreaktorkultivierung.....	119
Abb. 5.4.14:	Proteinkonzentration und FTF-Aktivität nach der Induktion bei der Bioreaktorkultivierung. A: Zellysatüberstand; B: inclusion bodies.....	120
Abb. 5.4.15:	Unterschiedliche Puffersysteme für den Ultraschallaufschluss.	121
Abb. 5.5.1:	Einfluss der Temperatur und des pH auf die katalytische Aktivität der recFTF _{His} : A: Temperaturabhängigkeit; B: Darstellung nach Arrhenius; C: Temperaturstabilität, Inaktivierungsraten und Halbwertszeiten; D: pH-Abhängigkeit.	122
Abb. 5.5.2:	Quantitative HPAEC-Analyse der Substratreaktion von recFTF _{His}	124
Abb. 5.5.3:	Saccharoseumsatz und Enzymkinetik nach Michaelis-Menten für die recFTF _{His} und recFTF _{Strep} A: Reaktion mit 250 mM Saccharose für die recFTF _{His} ; B: Michaelis-Menten-Graph der recFTF _{His} ; C: Reaktion mit 10 und 250 mM Saccharose für die recFTF _{Strep} ; D: Michaelis-Menten-Graph der recFTF _{Strep} für t = 0 - 0,5 min.	125
Abb. 5.5.4:	Bilanzierung der Transfructosylierung für die recFTF _{Strep} : A: relativer Anteil an verbrauchtem Substrat (schwarz); relativer Anteil polymerisierter Fructose in Bezug auf die verbrauchte Saccharose; B: Raum-Zeit-Ausbeute und -Fructosylierung; polymerisierte Saccharose zu polymerisierter Fructose; C: Anteil der Hydrolyse; D: Massenbilanz	127
Abb. 5.5.5:	Mittlere Reaktionsgeschwindigkeit für polymerisierte Fructosylreste bei Anwesenheit von Glucose.	131
Abb. 5.5.6:	Akzeptorreaktion mit Galactose:Saccharose mit der recFTF _{His}	132
Abb. 5.5.7:	Akzeptorreaktion mit Xylose:Saccharose mit der recFTF _{His}	133

Abb. 5.6.1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Adsorbentien: A: trockenes Bentonit; B: unbehandeltes Bentonit; C: konditioniertes Na-Bentonit der dichten Phase; D: konditioniertes Na-Bentonit der aufgeschwemmten Phase; E: Hydroxylapatit.....	138
Abb. 5.6.2:	Partikelgrößenverteilungen der Adsorbentien für die Verteilungssumme der Partikelmasse Q_3 und der Verteilungsdichte q_3 mit x_{50} und MPD	139
Abb. 5.6.3:	Thermogravimetrische Analyse des unbehandelten Bentonits und des lyophilisierten, konditionierten Na-Bentonits in oxidierender bzw. inerte Atmosphäre.....	143
Abb. 5.6.4:	Adsorptionsisothermen der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.....	144
Abb. 5.6.5:	Ausbeute an adsorbierter $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit in Bezug zu den eingesetzten Massenkonzentrationsverhältnissen	145
Abb. 5.6.6:	Aktivitätsadsorptionsisotherme der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.....	146
Abb. 5.6.7:	Aktivität der freien bzw. adsorbierten Proteinmenge für verschiedene Immobilisate	147
Abb. 5.6.8:	Substratumsätze von freier, aktiver und adsorbierter $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$ an Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.	149
Abb. 5.6.9:	Substratumsätze von freier und in Alginatematrix immobilisierter $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$...	152
Abb. 5.6.10:	Einfluss von freien Ionen unterschiedlicher Konzentration auf die Gesamtaktivität der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$	155
Abb. 5.6.11:	Einfluss von freien Ionen unterschiedlicher Konzentration auf die Transferaseaktivität der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$	156
Abb. 5.6.12:	Einfluss von freien Ionen unterschiedlicher Konzentration auf die Hydrolyseaktivität der $\text{recFTF}_{\text{Strep}}$	156
Abb. 5.6.13:	SDS-Gel der Überstände vom Dialysat ohne und mit Träger: Bentonit (B) und Hydroxylapatit (HA)	159
Abb. 5.6.14:	Substratumsätze von Dialysatsuspension und -überstand für Resolubilisat ohne Trägerzusatz und mit Hydroxylapatit.....	160
Abb. 5.6.15:	Stoffliche Bilanzierung der Transfructosylierung mit Saccharose für die Suspension und den Überstand für die trägervermittelte Rückfaltung. A: polymerisierte Fructose im Reaktionsverlauf, B: relativer Anteil polymerisierter Fructose zum Saccharoseumsatz.	161
Abb. 5.7.1:	Aufkonzentrierte <i>Aspergillus niger</i> Kulturüberstände für die induzierte und rekombinante Proteinexpression der SUC1 im Vergleich zur nicht induzierten Expression des Kontrollstammes.....	163
Abb. 5.7.2:	Einfluss der Temperatur und des pH auf die katalytische Aktivität der Suc1: A: Temperaturabhängigkeit; B: Darstellung nach Arrhenius zur Ermittlung der Aktivierungsenergie; C: Temperaturstabilität thermostatisierter Enzymchargen zur Darstellung der Inaktivierungsraten und Halbwertzeiten; D: pH-Abhängigkeit.	165

Abb. 5.7.3: Reaktionsgeschwindigkeit unter Standardbedingungen in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration und die Anpassung der Michaelis-Menten Funktion an die experimentell ermittelten Werte	166
Abb. 5.7.4: Stoffliche Bilanzierung der Transfructosylierung für die Suc1: A: relativer Anteil an verbrauchter Saccharose; relativer Anteil polymerisierter Fructose in Bezug den Saccharoseverbrauch; B: Raum-Zeit-Fructosylierung; Verhältnis polymerisierte Saccharose zu polymerisierter Fructose (rot); C: Massenbilanz.....	167
Abb. 5.7.5: Reaktionsschema zur Bildung höherer FOS, am Beispiel der Kestose- und Nystosesynthese.	169
Abb. 5.7.6: Reaktion der Suc1 mit Saccharose.....	169
Abb. 5.7.7: Akzeptorreaktion der Suc1 mit Saccharose und Galactose.	170
Abb. 5.7.8: Akzeptorreaktion der Suc1 mit Saccharose und Xylose.....	170
Abb. 5.7.9: Die mittels Substratvariation (Glu-, Gal-, Xyl-, Man-Fru) gewonnenen Produkte 1-Kestose und 1-Nystose sowie deren Strukturanaloga aus der enzymatischen Umsetzung durch die Suc1	171
Abb. 5.7.10: FOS-Synthese aus Saccharose und Strukturanaloga: A) Bildung von 1-Kestose und 1-Nystose aus Saccharose; B) Bildung von Man-(Fru) ₂ und Man-(Fru) ₃ aus Man-Fru; C) Bildung von Gal-(Fru) ₂ und Gal-(Fru) ₃ aus Gal-Fru; D) Bildung von Xyl-(Fru) ₂ und Xyl-(Fru) ₃ aus Xyl-Fru.....	172
Abb. 10.1.1: Kultivierung mit 25,0 und 35,0 g/l Saccharose und mit 6,2 und 8,7 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ für den Verbrauch vollständig freigesetzter Glucose sowie 12,4 und 17,4 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ für vollständige Saccharoseverwertung (S12 - S15). .	224
Abb. 10.2.1: FPLC-Anionentauscher Aufreinigung (Resource Q) mit Tris (pH 6,8) in einem NaCl-Gradienten.....	224
Abb. 10.2.2: FPLC-Anionentauscher Aufreinigung (Source Q) mit Tris (pH 6,8) in einem NaCl Gradienten.....	225
Abb. 10.2.3: FPLC-Kationentauscher Aufreinigung (CM Sepharose) mit Phosphatpuffer (pH 6,0) in einem Pufferkonzentrationsgradienten.....	225
Abb. 10.7.1: FPLC-Anionentauscher Aufreinigung (Resource Q) der recFTF _{His} aus <i>E. coli</i> Zelllys. A: Auftrennung mit Tris (pH 6,8) in einem NaCl Gradienten, B: SDS-Gel der Fraktionen Überstand und Eluat, C: FTF-Aktivität der Fraktionen in der Akzeptorreaktion mit Galctose.	230
Abb. 10.8.1: Korrelation der Aktivität und der Enzymkonzentration. Vergleich der IB-Renaturierung zur Verdünnung der aufkonzentrierten Probe.....	230
Abb. 10.9.1: Batch-Bioreaktorkultivierung von <i>E. coli</i> Rosetta recFTF _{Strep} mit den Kultivierungsparametern Rührerdrehzahl, Sauerstoffpartialdruck, Temperatur und pH	231
Abb. 10.10.1: Dünnschichtchromatographie der Reaktion von recFTF _{His} mit Saccharose.	231
Abb. 10.11.1: Akzeptorreaktion mit Galactose:Saccharose mit der wt-FTF aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871 (DC- Auftrennung)	232

Abb. 10.11.2: Akzeptorreaktion mit Xylose:Saccharose mit der wt-FTF aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871 (DC- Auftrennung)	232
Abb. 10.12.1: Akzeptorreaktion von recFTF _{His} mit Saccharose und Galactose (DC).....	233
Abb. 10.12.2: Akzeptorreaktion von recFTF _{His} mit Saccharose und Xylose (DC).	233
Abb. 10.13.1: Substratumsätze von Dialysatsuspension und -überstand für Resolubilisat ohne und mit Hydroxylapatit	234
Abb. 10.13.2: Stoffliche Bilanzierung der Transfructosylierung mit Saccharose für die Suspension und den Überstand bei der trägervermittelten Rückfaltung mit Hydroxylapatit. A: polymerisierte Fructose, B: relativer Anteil polymerisierter Fructose in Bezug auf den Saccharoseumsatz.	234

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.1: Funktionen von Glycanstrukturen in Glycoproteinen.....	5
Tab. 2.2.1: Eigenschaften von Oligosacchariden.....	6
Tab. 2.2.2: Auswirkung auf die prozentuale Zusammensetzung der menschlichen mikrobiellen Intestinalmikroflora durch die Aufnahme von Saccharose, Oligofructose bzw. Inulin	7
Tab. 2.4.1: Bakterielle Fructosyltransferasen der Strukturfamilie GH 68 und deren kinetische Parameter für Saccharose.	13
Tab. 2.4.2: Sequenzmotive im aktiven Zentrum von Glycosidhydrolasen	15
Tab. 4.2.1: Verwendete Mikroorganismen	53
Tab. 4.2.2: Verwendete Plasmide.....	54
Tab. 4.2.3: Oligonukleotide.....	55
Tab. 4.8.1: Medienoptimierung für die Schüttelkolbenkultivierung	80
Tab. 4.8.2: Fermenterkultivierung: Einfluss der Medienbestandteile.....	81
Tab. 4.10.1: Standardversuchsbedingungen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	84
Tab. 5.3.1: Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung	101
Tab. 5.3.2: Nukleotidabweichungen zwischen der FTF aus <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871 und <i>Bacillus subtilis</i> 168.	101
Tab. 5.3.3: Sequenzanalyse auf Protein- und DNA-Ebene mit bzw. ohne Signalsequenz.....	103
Tab. 5.4.1: Aufreinigung der recFTF _{His} mittels Resource Q.....	110
Tab. 5.4.2: Affinitätschromatographische recFTF _{Strep} -Aufreinigung.	112
Tab. 5.4.3: recFTF _{Strep} -Aufreinigung der inclusion bodies.	113
Tab. 5.4.4: Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von Konzentrierung renaturierter recFTF _{Strep} aus verschiedenen Kultivierungen.	115
Tab. 5.5.1: Kinetische Parameter von FTFs aus natürlicher und rekombinanter Produktion für die Reaktion mit Saccharose. Literaturvergleich mit FTF, recFTF _{His} und recFTF _{Strep}	127
Tab. 5.5.2: Vergleich der Enzymfraktionen wt-FTF, recFTF _{His} und recFTF _{Strep} in der Akzeptorreaktion mit Galactose.....	134

Tab. 5.5.3:	Enzymatische Synthese von Polyfructan und den Saccharoseanaloge Gal-Fru bzw. Xyl-Fru mit unterschiedlichen Fructosyldonatoren (Saccharose bzw. Raffinose).....	135
Tab. 5.5.4:	Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die recFTF _{His} bei der Reaktion mit Saccharose, der Galactose- sowie Xylose-Akzeptorreaktion.	137
Tab. 5.6.1:	Spezifische Oberfläche verwendeter Trägermaterialien durch N ₂ -Adsorption mittels BET-Messverfahren.	140
Tab. 5.6.2:	Elementverteilung der Trägermaterialien durch energiedispersive Röntgenspektroskopie am Rasterelektronenmikroskop.	141
Tab. 5.6.3:	Elementaranalyse des unbehandelten Bentonitrohmaterials.....	143
Tab. 5.6.4:	Kennwerte der Adsorptionsisothermen nach Langmuir für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.....	144
Tab. 5.6.5:	Kennwerte der Aktivitätsadsorptionsisothermen nach Langmuir für Bentonit, Na-Bentonit und Hydroxylapatit.	146
Tab. 5.6.6:	Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die freie und die adsorbierte recFTF _{Strep}	149
Tab. 5.6.7:	Kennwerte der Protein- und Aktivitätsadsorptionsisothermen nach Langmuir bei Eupergit C.....	151
Tab. 5.6.8:	Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die freie und die in Alginat immobilisierte recFTF _{Strep}	153
Tab. 5.6.9:	Kenndaten für die unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden in Bezug auf die freie Fructosyltransferase recFTF _{Strep}	157
Tab. 5.6.10:	Proteinkonzentrationen der Dialyseausgangslösungen und -überstände.....	159
Tab. 5.6.11:	Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität für die freie und die adsorbierte recFTF _{Strep}	161
Tab. 5.7.1:	Verteilung der Transfructosylierungs- und Hydrolyseaktivität verschiedener β -Fructofuranosidasen bei der Reaktion mit Saccharose.....	168
Tab. 5.7.2:	Enzymatische Synthese von FOS aus Saccharose sowie deren Strukturanaloga Man-Fru, Gal-Fru und Xyl-Fru als einziges Substrat.	173
Tab. 10.6.1:	Codon usage von Produktionsstämmen zum rekombinanten Enzym.....	229

10 Anhang

10.1 Kultivierung unter Berücksichtigung des C/N-Verhältnisses

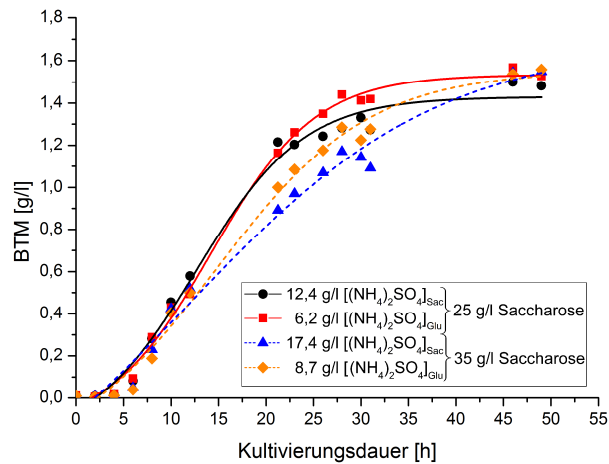


Abb. 10.1.1: Kultivierung mit 25,0 und 35,0 g/l Saccharose und mit 6,2 und 8,7 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für den Verbrauch vollständig freigesetzter Glucose (Glu) sowie 12,4 und 17,4 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ für vollständige Verwertung der Saccharose (S12 - S15).

10.2 Präparative FTF-Separation der *Bacillus* Überstände mittels FPLC

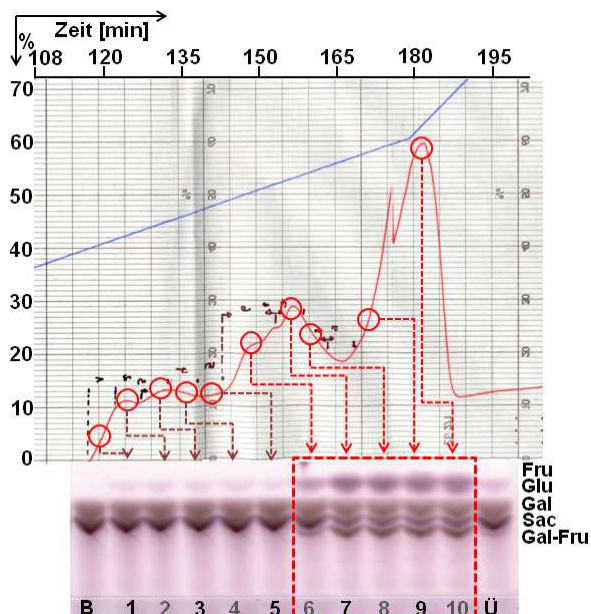


Abb. 10.2.1: FPLC-Anionentauscher Aufreinigung (Resource Q) mit 0,1 M Tris (pH 6,8) in einem NaCl-Gradienten von 6,7 mM/min. Aktivität der Akzeptorreaktion (1 M Gal / 0,5 M Sac).

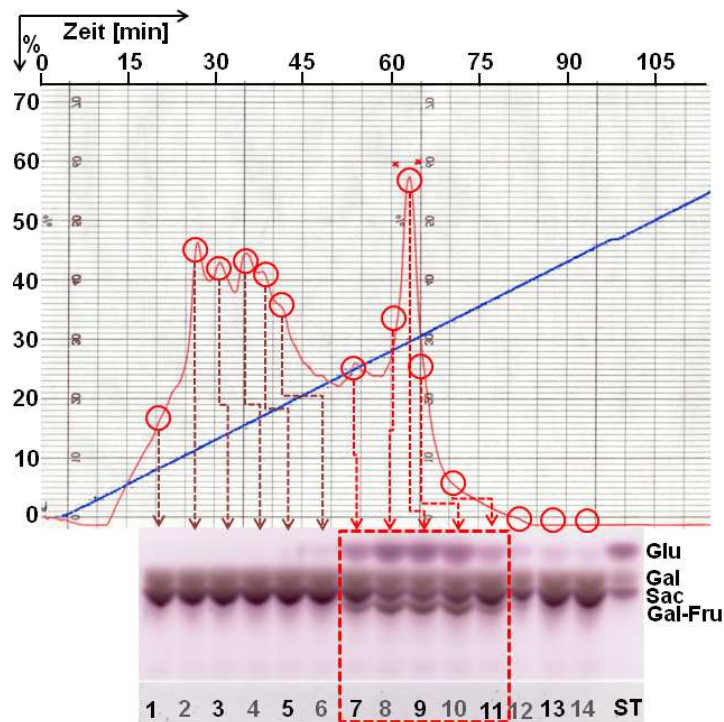


Abb. 10.2.2: FPLC-Anionentauscher Aufreinigung (Source Q) mit 0,1 M Tris (pH 6,8) in einem NaCl Gradienten von 10 mM/min. Aktivität der Akzeptorreaktion (1 M Gal / 0,5 M Sac).

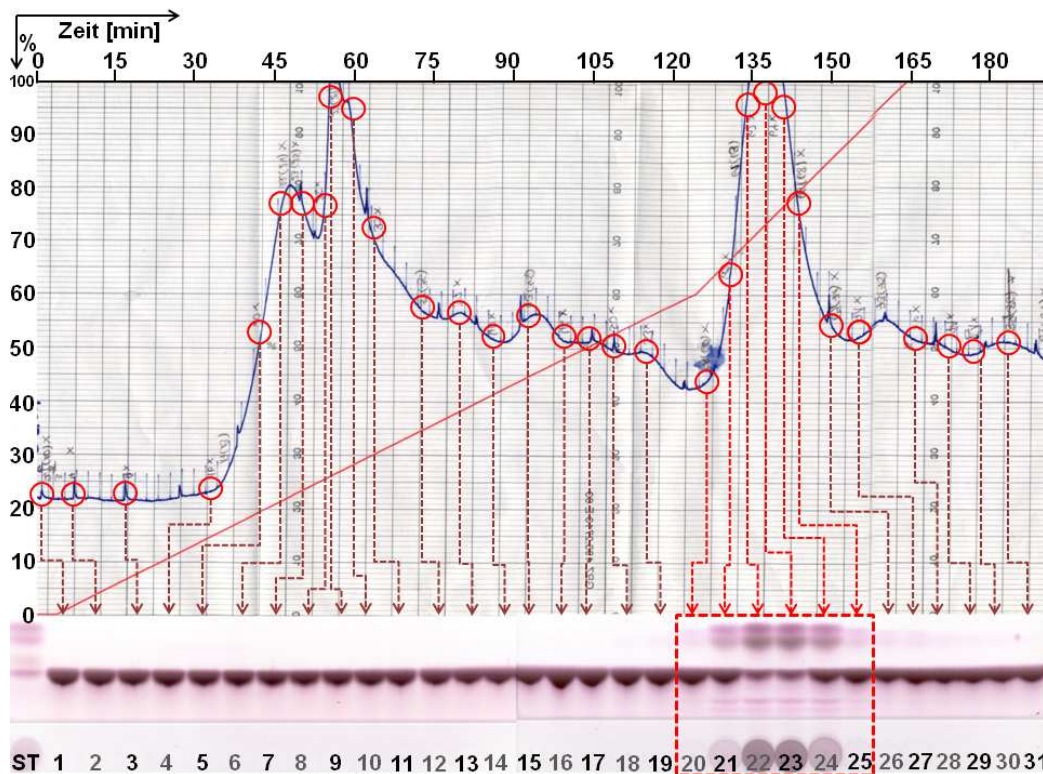


Abb. 10.2.3: FPLC-Kationentauscher Aufreinigung (CM Sepharose) mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 6,0) in einem Pufferkonzentrationsgradienten bis 1 M (5 bzw. 8,9 mM/min). FTF-Aktivität in der Reaktion mit 0,5 M Saccharose.

10.3 DNA-Sequenz der FTF Wildtyp / His-Tag Variante aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871

ATGAACATCAAAAAGTTTGC AAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCAGGAGGCGCAACT
 CAAGCGTTTGC GAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTTC CATATTACACGCCATGAT
 ATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAATGAAAAATATCAAGTTCCTGAATTCGATTTCGTCCACAATTAAAAAT
 ATCTCTTCTGCAAAAGGCCTGGAC **GTTTGGGAC** AGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTGCAAACTAT
CATGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTAT
 CAAAAGTCGGCGAAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGAT
 GCAAATGATTCTATCCTAAAAGACCAA**ACG**CAA **GAATGGTCAGGT**TCAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATC
 CGTTTATTCTACTGATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAACACTGACAAC**GCACAG**GTTAACGTATCA
 GCATCAGACAGCTCT**CTGA**ACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGAC**GGC**AAAAACGTAT
 CAAAATGTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTG**AGAGATCCT**CACTAC
 GTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACACTGGAACTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAA
 TCTTTATTTAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCACATCATTCTTCCGTCAAGAAAGTCAAAA**AGCT**TCTGCAAA**AGT**
 GATAAA**AGCGCACT**GCT**GA**ATTAG**CT**TAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGATGATTACACACTGAAA
 AAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACA**GATGAAATTGAACGC**GCGAACGCTCTTTAAATGAAC
 GGCAAATGG**TAT**CTGTTCACTGACTCCCG**CGG**GTCAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTAC
 ATGCTT**GGC**TATGTTTCTAATTCTTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTTAAAAATG
 GATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTG
 ATTACAAGCTATATGACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGCGCCAAAGCTTCCTGCTGAAC
 ATCAAAGGCAAGAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAAACAA**↓** **TAA**
Rot ATG & TAA = Start/Stop Codon des Genes, **Blau** = Signalsequenz, **Fett Schwarz/Rot** =
 mutiertes Codon/Basenaustausch gegenüber *B. subtilis* 168, unterstrichen = *HindIII*-
 Schnittstellen, ↓ = (His)₆-Tag (CTCGAGCACCACCACCACCACCAC), **Gelb** = hochkonservierte AS-
 Bereiche VWD₍₈₆₎, EWSG₍₁₆₅₎, RDP₍₂₄₈₎ bzw. DEIER₍₃₄₃₎

10.4 DNA-Sequenz der FTF Strep-Tag Variante

ATGGC AAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTTC CATATTACACGCCATGATATGCTG
 CAAATCCCTGAACAGCAAAAAATGAAAAATATCAAGTTCCTGAATTCGATTTCGTCCACAATTAAAAATATCTCT
 TCTGCAAAAGGCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTGCAAACTATCACGGC
 TACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAA
 GTCGGCGAAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAAAT
 GATTCTATCCTAAAAGACCAACACAAGAATGGTCAGGTTAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTA
 TTCTACTACTGATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAACACTGACAAC**GCACA**AGTTAACGTATCAGCATCA
 GACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAAAAT
 GTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAA
 GATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACACTGGAACTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTA
 TTTAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCACATCATTCTTCCGTCAAGAAAGTCAAAAGCTTCTGCAAGCGATAAA
 AAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGATGATTACACACTGAAAAAGTG
 ATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAAATTGAACGCGCAACGCTCTTTAAATGAACGGCAAA
 TGGTACCTGTTCACTGACTCCCGCGGATCAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCTT
 GGTATGTTTCTAATTCTTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTTAAAAATGGATCTT
 GATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTGATTACA
 AGCTATATGACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGCGCCAAGCTTCCTGCTGAACATCAAA
 GGCAAGAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAAACAA**CTCGAGAGCGCT**
TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATAATGA

Rot = Start/Stop Codon des Genes, **Grün** = Spacer-AS, **Orange** = Streptavidin-Tag

10.5 Codon usage Adaption mit JCat (nach Grote *et al.*, 2005)

Nukleotidaustausch zur Translationsoptimierung auf genetischer Ebene für *E. coli*

Schwarz/Weiß: Übereinstimmung/Abweichung original zu adaptierter Sequenz (FTF/adFTF)

↓ die 29 Precursor-AS wurden berücksichtigt

FTF	1	ATGGCCAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGCJAAACATACGGCATTTCCCATATTACA
adFTF	1	ATGGCTAAAGAAACCAACCAGAAACCGTACAAAGTAAACCTACGGTATCTCTCACATCACC
FTF	61	CGCCATGATATGCTGCAATCCCTGAACAGCAAAAAATGAAAAATATCAAGTTCCTGAA
adFTF	61	CGTCACGACATGCTGCAGATCCCGGAACAGCAGAAAAACGAAAAATACCAAGTTCCTGGAA
FTF	121	TTCGATTTCGTCCACAATTAAAAATATCTCTTCTGCAAAAGGCCTGGACGTTTGGGACAGC
adFTF	121	TTGCACTCTTCTACCATCAAAAAATCTCTTCTGCTAAAGGCTCTGGACGTTTGGGACTCT
FTF	181	TGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTGCAAACTATCACGGCTACCACATCGTCTTT
adFTF	181	TGGCCGCTGCAGAACGCTGACGGTACCGTTGCTAACTACCACGGTTACCACATCGTCTTTC
FTF	241	GCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTACATGTTCTATCAAAAA
adFTF	241	GCTCTGGCTGGTGACCCGAAAAACGCTGACGACACCTCTATCTACATGTTCTACCAGAAA
FTF	301	GTCGGCGAAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCGCGTCTTTTAAAGACAGCGAC
adFTF	301	GTTGGTGAAACCTCTATCGACTCTTGGAAAAACGCTGCTCGTGTCTTCAAAGACTCTGAC
FTF	361	AAATTCGATGCAAAATGATTCTATCCTTAAAGACCACAAACAAGATGGTCAGGTTTCAGCC
adFTF	361	AAATTCGACGCTAACGACTCTATCCTGAAAGACCAGACCCAGGAATGGTCTGGTTCTGCT
FTF	421	ACATTTACATCTGACGGAATAATCCGTTTATTCTACACTGATTTCTCCGGTAAACATTAC
adFTF	421	ACCTTCACCTCTGACGGTAAAAATCCGCTCTGTTCTACACCGACTTCTCTGGTAAACACTAC
FTF	481	GGCAAAACAAACACTGACAACCTGCACAAGTTAACGTATCAGCATCAGACAGCTCTTTGAAC
adFTF	481	GGTAAACAGACCTGACCACCGCTCAGGTTAACGTTCTGCTCTGACTCTTCTCTGAAC
FTF	541	ATCAACGGTGTTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAAAAT
adFTF	541	ATCAACGGTGTTGAAGACTACAAATCTATCTTTCGACGGTGACGGTAAACCTACCAGAAC
FTF	601	GTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCACAAACCATACGCTGAGAGAT
adFTF	601	GTTACAGCAGTTCATCGACGAAGGTAACCTACTCTCTGCTGACAACCACACCCTGCGTGAC
FTF	661	CCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTACTATTGGAAGCAACACTGGAACCT
adFTF	661	CCGCACTACGTTGAAGACAAAGGTCACAAATACCTGGTTTTCGAAGCTAACACCGGTACC
FTF	721	GAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCACA
adFTF	721	GAAGACGGTTACCAGGCTGAAGAATCTCTGTTCAACAAAGCTTACTACGGTAAATCTACC
FTF	781	TCATTCTTCCGTCAGAAAGTCAAAAACCTTCTGCAAGCGATAAAAAACGCACGGCTGAG
adFTF	781	TCTTTCTTCCGTCAGGAATCTCAGAAACTGCTGCAGTCTGACAAAAAACGTACCCTGAA
FTF	841	TTAGCAAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGATGATTACACACTGAAAAAAGTG
adFTF	841	CTGGCTAACGGTGCTCTGGGTATGATCGAACTGAACGACGACTACACCCTGAAAAAAGTT
FTF	901	ATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAAATTGAACGCGCGAACGTCCTTT
adFTF	901	ATGAAACCGCTGATCGCTTCTAACACCGTTACCGACGAAATCGAACGTCCTAACGTTTTC
FTF	961	AAAATGAACGGCAAAATGGTACCTGTTCACTGACTCCCGCGGATCAAAAATGACGATTGAC
adFTF	961	AAAATGAACGCTAAATGGTACCTGTTCACTGACTCTCGTGGTTCTTAAATGACCATCGAC

FTF	1021	GGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTTTCTAATTCCTTTAACTGGCCCA
adFTF	1021	GGTATCACCTCTAACGACATCTACATGCTGGGTTACGTTTCTAACTCTCTGACCGGTCCG
FTF	1081	TACAAGCCGCTGAACAAAACTGGCCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGATCCTAACGATGTA
adFTF	1081	TACAAAACCGCTGAACAAAAACGGTCTGTTCTGAAAATGGACCTGGACCCGAACGACGTT
FTF	1141	ACCTTTACTTACTCACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTGATTACA
adFTF	1141	ACCTTCACCTACTCTCACTTCGCTGTTCCGCAGGCTAAAGGTAACAACGTTGTTATCACC
FTF	1201	AGCTATATGACAAACAGAGGATTTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGCGCCAAGCTTC
adFTF	1201	TCTTACATGACCAACCGTGGTTTCTACGCTGACAAACAGTCTACCTTCGCTCCGTCTTTC
FTF	1261	CTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGA
adFTF	1261	CTGCTGAACATCAAAGGTAATAAAAACCTCTGTTGTATAAGACTCTATCCTGGAACAGGGT
FTF	1321	CAATTAAACAGTTAACAAACTCGAGAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAATGA
adFTF	1321	CAGCTGACCGTTAACAAACTGGAATCTGCTTGGTCTCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAA

10.6 Codon usage von Produktionsstämmen zum rekombinanten Enzym

Stamm/ Protein	<i>E. coli</i> K12 ¹⁾	<i>B. sub-</i> <i>tilis</i> ²⁾	recFTF Strep- Tag ³⁾	recFTF adFTF ⁴⁾	Stamm/ Protein	<i>E. coli</i> K12 ¹⁾	<i>B. sub-</i> <i>tilis</i> ²⁾	recFTF Strep- Tag ³⁾	recFTF adFTF ⁴⁾
Codon/AS	[%(‰)]	[%(‰)]	[%(‰)]	[%(‰)]	Codon/AS	[%(‰)]	[%(‰)]	[%(‰)]	[%(‰)]
Alanin (A)					Lysin (K) ←				
GCA	27,2 (23,0)	27,8 (21,1)	45,8 (24,0)	0,0 (0,0)	AAA	70,9 (37,2)	69,9 (48,4)	90,5 (82,8)	100 (91,5)
GCC	25,6 (21,6)	21,7 (16,5)	12,5 (6,5)	0,0 (0,0)	AAG	29,1 (15,3)	30,1 (20,8)	9,5 (8,7)	0,0 (0,0)
GCG	24,9 (21,1)	26,1 (19,8)	16,7 (8,7)	0,0 (0,0)	Methionin (M)				
GCU	22,3 (18,9)	24,4 (18,6)	25,0 (13,1)	100 (52,3)	AUG	100 (23,7)	100 (26,3)	100 (21,8)	100 (21,8)
Arginin (R)					Phenylalanin (F)				
AGA	13,2 (7,1)	25,4 (10,5)	22,2 (4,4)	0,0 (0,0)	UUC	36,4 (13,9)	32,3 (14,3)	59,1 (28,3)	100 (47,9)
AGG	7,4 (4,0)	9,9 (4,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	UUU	63,6 (24,4)	67,7 (30,0)	40,9 (19,6)	0,0 (0,0)
CGA	8,9 (4,8)	10,5 (4,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	Prolin (P)				
CGC	26,1 (14,0)	19,9 (8,2)	55,6 (10,9)	0,0 (0,0)	CCA	23,2 (9,1)	18,9 (7,1)	30,8 (8,7)	0,0 (0,0)
CGG	14,7 (7,9)	16,8 (6,9)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	CCC	15,7 (6,2)	9,3 (3,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
CGU	29,6 (15,9)	17,5 (7,2)	22,2 (4,4)	100 (19,6)	CCG	36,9 (14,5)	43,5 (16,3)	23,1 (6,5)	100 (28,3)
Asparagin (N) ←					CCU	24,2 (9,5)	28,2 (10,6)	46,2 (13,1)	0,0 (0,0)
AAC	40,9 (20,3)	43,7 (17,8)	76,7 (50,1)	100 (65,4)	Serin (S) ←				
AAU	59,1 (29,3)	56,3 (22,9)	23,3 (15,3)	0,0 (0,0)	AGC	19,9 (14,3)	22,8 (14,4)	29,3 (26,1)	0,0 (0,0)
Aspartat (D) ←					AGU	18,4 (13,2)	10,8 (6,8)	2,6 (2,1)	0,0 (0,0)
GAC	34,6 (17,9)	36,4 (19,0)	45,9 (37,0)	100 (80,6)	UCA	18,3 (13,1)	23,0 (14,6)	24,4 (21,1)	0,0 (0,0)
GAU	65,4 (33,7)	63,6 (33,2)	54,1 (43,6)	0,0 (0,0)	UCC	13,6 (9,7)	13,1 (8,3)	9,8 (8,7)	0,0 (0,0)
Cystein (C)					UCG	11,4 (8,2)	10,2 (6,5)	5,1 (4,1)	0,0 (0,0)
UGC	48,3 (5,5)	54,2 (4,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	UCU	18,3 (13,1)	20,0 (12,7)	29,3 (26,1)	100 (89,3)
UGU	51,7 (5,9)	45,8 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	Threonin (T) ←				
Glutamin (Q)					ACA	24,9 (15,1)	39,9 (21,6)	48,6 (37,0)	0,0 (0,0)
CAA	35,0 (14,4)	52,4 (20,4)	82,6 (41,4)	0,0 (0,0)	ACC	2,9 (2,2)	16,6 (9,0)	7,5 (6,2)	100 (76,3)
CAG	65,0 (26,7)	47,6 (18,5)	17,4 (8,7)	100 (50,1)	ACG	20,0 (15,3)	27,4 (14,9)	17,5 (14,5)	0,0 (0,0)
Glutamat (E)					ACU	21,5 (13,1)	16,0 (8,7)	28,6 (21,8)	0,0 (0,0)
GAA	64,4 (35,1)	68,0 (48,1)	81,8 (39,2)	100 (47,9)	Tryptophan (W)				
GAG	35,6 (19,4)	32,0 (22,6)	18,2 (8,7)	0,0 (0,0)	UGG	100 (13,4)	100 (10,7)	100 (13,1)	100 (13,1)
Glycin (G)					Tyrosin (Y) ←				
GGA	19,4 (13,6)	31,5 (21,8)	24,2 (17,4)	0,0 (0,0)	UAC	35,1 (11,7)	35,2 (12,6)	64,0 (34,9)	100 (54,5)
GGC	29,3 (20,6)	33,6 (23,3)	57,6 (41,4)	0,0 (0,0)	UAU	64,9 (21,6)	64,8 (23,3)	36,0 (19,6)	0,0 (0,0)
GGG	17,5 (12,3)	16,1 (11,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	Valin (V)				
GGU	33,8 (23,7)	18,7 (13,0)	18,2 (13,1)	100 (71,9)	GUA	19,3 (13,1)	19,7 (13,0)	33,3 (17,4)	0,0 (0,0)
Histidin (H)					GUC	19,4 (13,1)	26,0 (17,3)	28,0 (14,5)	0,0 (0,0)
CAC	37,2 (7,3)	32,4 (7,5)	60,0 (13,1)	100 (21,8)	GUG	29,4 (19,9)	26,1 (17,3)	12,5 (6,5)	0,0 (0,0)
CAU	62,8 (12,4)	67,6 (15,7)	40,0 (8,7)	0,0 (0,0)	GUU	31,9 (21,6)	28,1 (18,6)	25,0 (13,1)	100 (52,3)
Isoleucin (I)					Stop				
AUA	21,4 (13,3)	13,4 (9,8)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	UAA	57,7 (2,0)	60,9 (1,9)	100 (2,2)	100 (2,2)
AUC	31,1 (19,4)	37,2 (27,2)	45,5 (21,8)	100 (47,9)	UAG	9,3 (0,3)	14,9 (0,5)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
AUU	47,5 (29,6)	49,5 (36,2)	54,5 (26,1)	0,0 (0,0)	UGA	33,1 (1,1)	24,2 (0,8)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Leucin (L)					Wobei die „codon usage“ bei				
CUA	5,7 (5,6)	5,1 (4,9)	6,7 (4,4)	0,0 (0,0)	¹⁾ aus 2330943 Codons 8087 codierender Sequenzen ¹⁾ ,				
CUC	9,7 (9,5)	11,1 (10,7)	6,7 (4,4)	0,0 (0,0)	²⁾ aus 815445 Codons 2529 codierender Sequenzen ²⁾ ,				
CUG	38,5 (37,5)	24,0 (23,0)	36,7 (24,0)	100 (65,4)	³⁾ aus 459 Codons der Strep-SacB ohne Signalpeptid,				
CUU	14,9 (14,5)	22,7 (21,8)	16,7 (10,9)	0,0 (0,0)	⁴⁾ aus 459 Codons adaptierte Strep-SacB mit JCat (s.o.),				
UUA	17,9 (17,4)	20,7 (19,8)	30,0 (19,6)	0,0 (0,0)	⁵⁾ Codon usage Database (2013), Blattner <i>et al.</i> (1997)				
UUG	13,3 (12,9)	16,5 (15,8)	3,3 (2,2)	0,0 (0,0)					

← : mindestens 1,5 % höherer Aminosäuregesamtanteil recFTF im Vgl. zu *E. coli* (s.a. Abb. 5.4.5)

Fett : Codons mit mind. +15% AS-Einbau und/oder (+5‰) Codonfrequenz als im Wirtsorganismus

10.7 Präparative FPLC-Separation der recFTF_{His} aus *Escherichia coli* Extrakten

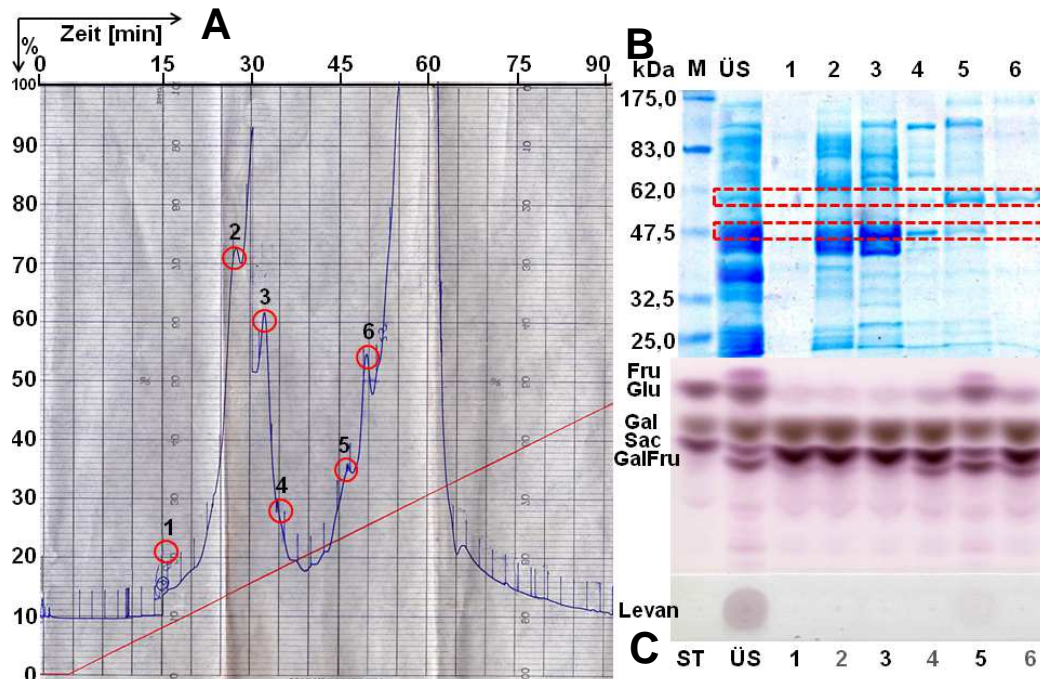


Abb. 10.7.1: FPLC-Anionentauscher Aufreinigung (Resource Q) der recFTF_{His} aus *E. coli* Zelllysats. **A:** Auftrennung bei 0,1 M Tris (pH 6,8) in einem NaCl Gradienten von 6,7 mM/min, **B:** SDS-Gel der Fraktionen ÜS (Überstand, 1:50) und 1 - 6 (Eluat, 1:1), **C:** FTF-Aktivität der Fraktionen in der Akzeptorreaktion (1 M Gal / 0,5 M Sac).

10.8 spezifische Aktivität für die Konzentrierung und Verdünnung der recFTF

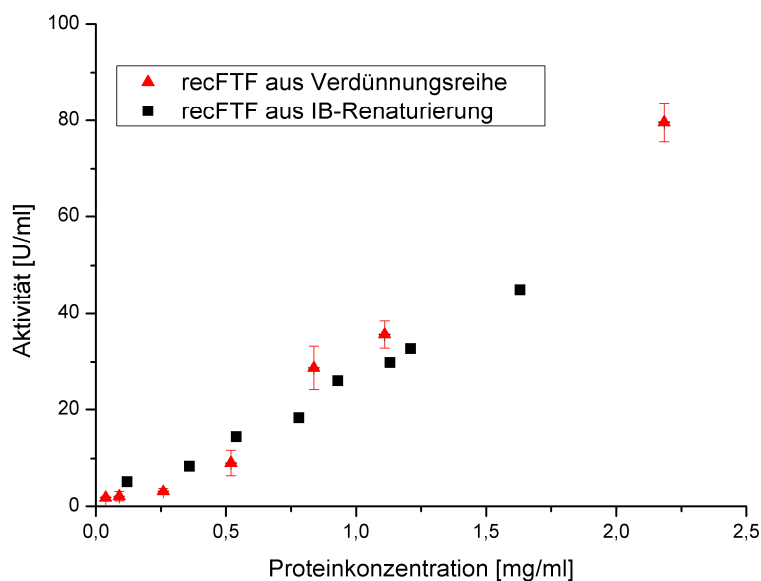


Abb. 10.8.1: Korrelation der Aktivität und der Enzymkonzentration. Vergleich der IB-Renaturierung (Abb. 5.4.10) zur Verdünnung der aufkonzentrierten Probe.

10.9 Batch-Bioreaktorkultivierung von *E. coli* Rosetta recFTF_{Strep}

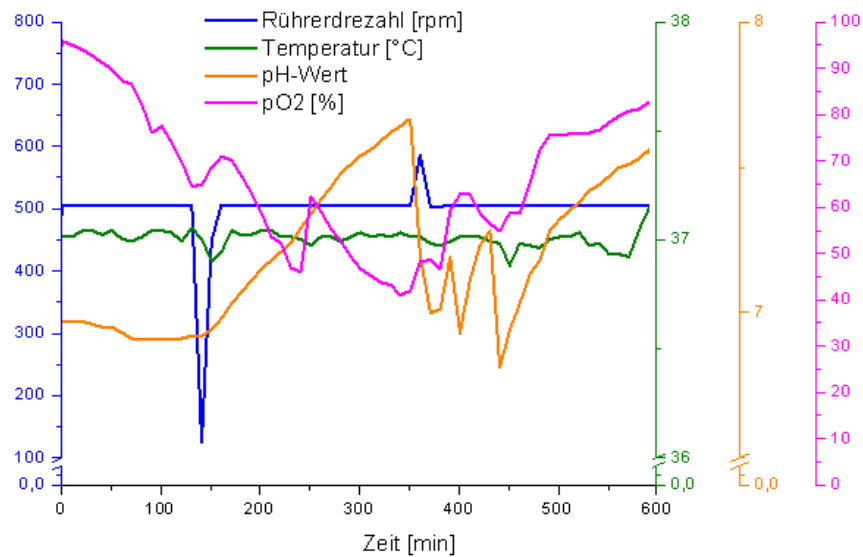


Abb. 10.9.1: Batch-Bioreaktorkultivierung von *E. coli* Rosetta recFTF_{Strep}. Betrachtung der Kultivierungsparameter Rührerdrehzahl in rpm (blau), Sauerstoffpartialdruck pO₂ in % (pink), Temperatur in °C (grün) und pH (gelb). Induktion erfolgt bei 130 min.

10.10 Reaktion der recFTF_{His} mit Saccharose

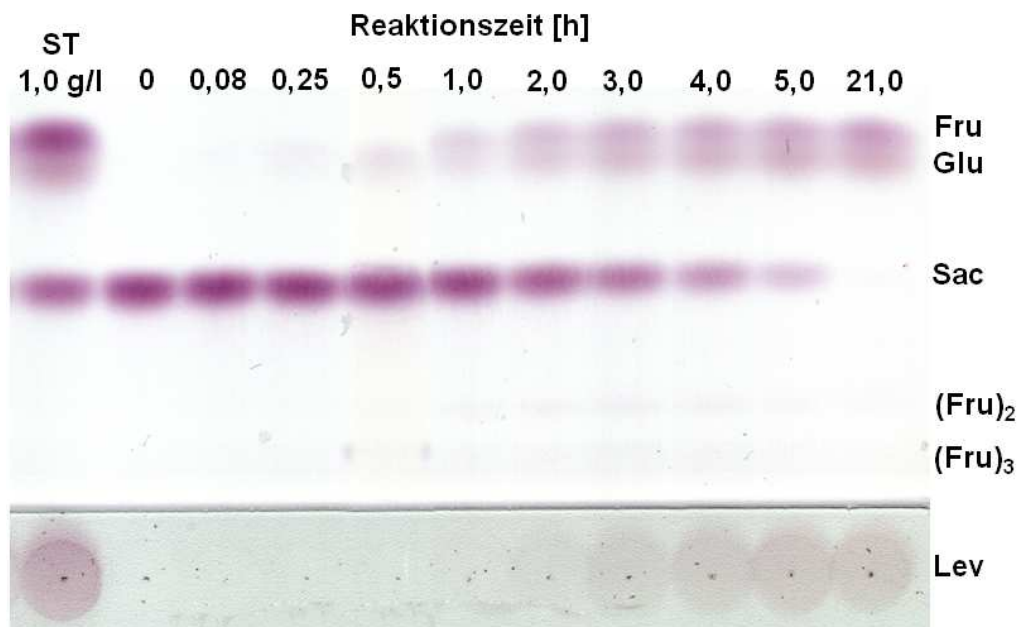


Abb. 10.10.1: Dünnschichtchromatographie der Reaktion von recFTF_{His} mit 500 mM Saccharose unter Standardreaktionsbedingungen.

10.11 Bildung von den Akzeptorprodukten Galactosyl- und Xylosylfructosid durch die wt-FTF

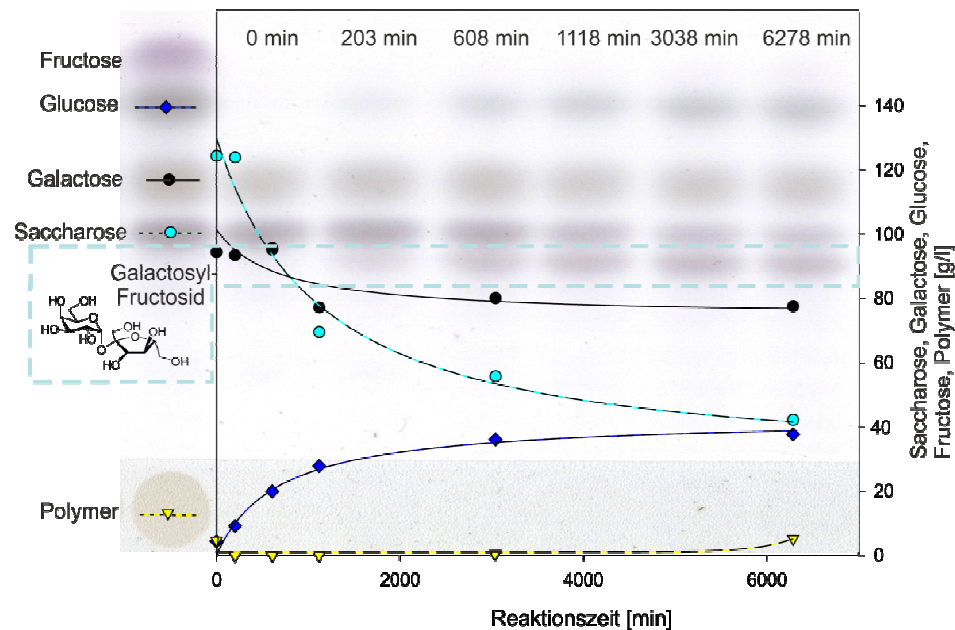


Abb. 10.11.1: Akzeptorreaktion mit Galactose:Saccharose (0,5 M_{Gal}:0,34 M_{Sac}; 1,5:1) mit der wt-FTF (2 mU/ml_{Reaktionslg}) aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 unter Standardbedingungen. In der DC- Auftrennung ist die Bildung von Galactosylfructosid ersichtlich.

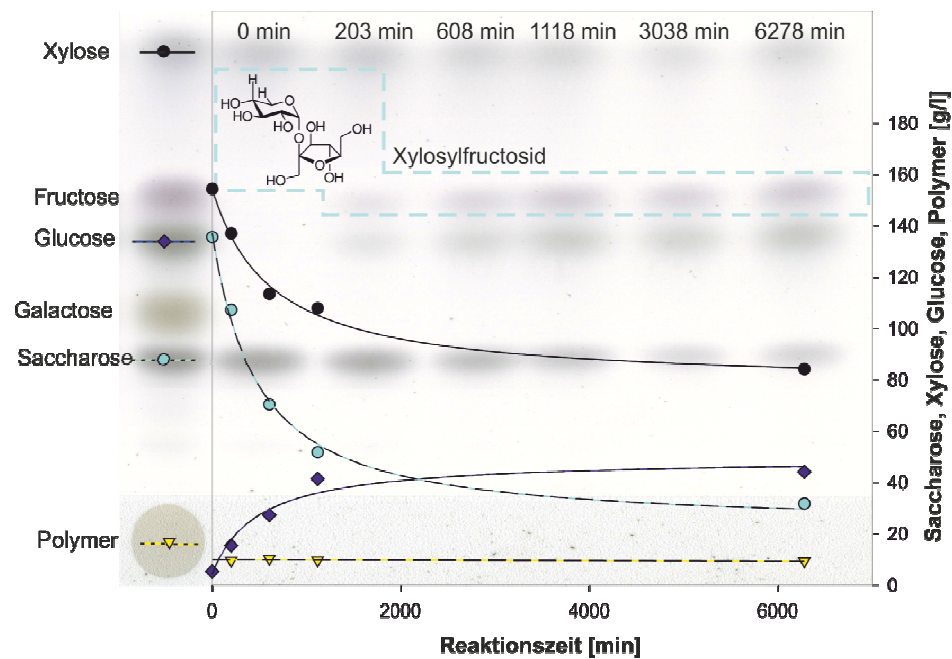


Abb. 10.11.2: Akzeptorreaktion mit Xylose:Saccharose (1,0 M_{Xyl}:0,4 M_{Sac}; 2,5:1) mit der wt-FTF (2 mU/ml_{Reaktionslg}) aus *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 unter Standardbedingungen. In der DC- Auftrennung ist die Bildung von Xylosylfructosid ersichtlich, welche mit dem Fructose-Spot überlagert ist.

10.12 Akzeptorreaktion der recFTF_{His} zur Produktion von Galactosyl- und Xylosylfructosid

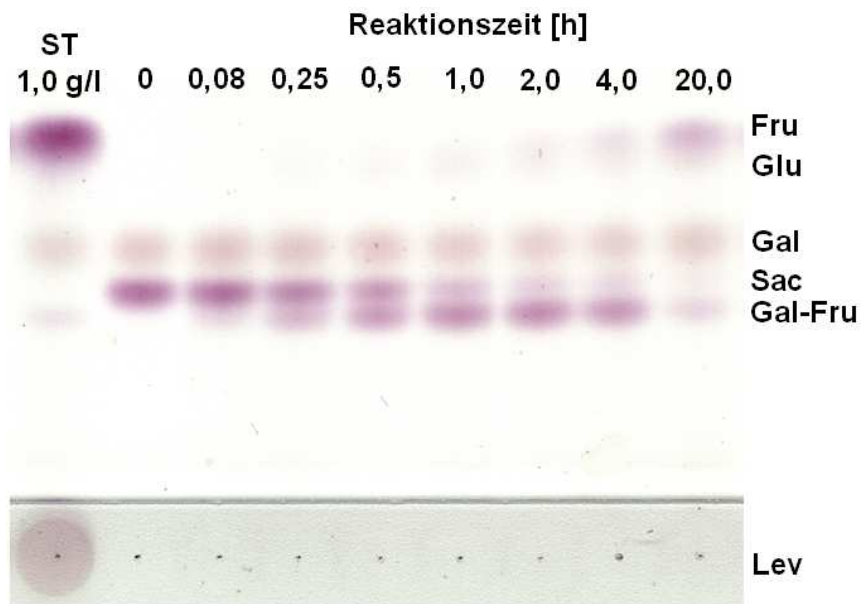


Abb. 10.12.1: Akzeptorreaktion von recFTF_{His} mit 0,6 M Saccharose und 1,2 M Galactose unter Standardreaktionsbedingungen.

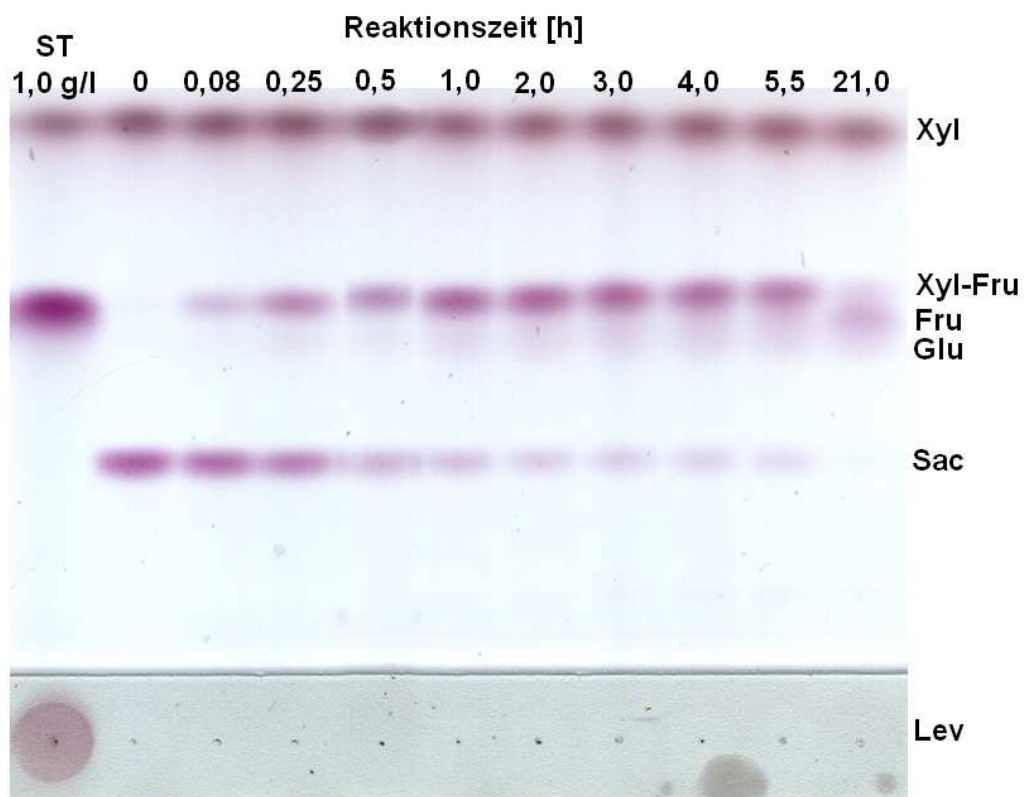


Abb. 10.12.2: Akzeptorreaktion von recFTF_{His} mit 0,6 M Saccharose und 1,2 M Xylose unter Standardreaktionsbedingungen.

10.13 FTF-Adsorption an Hydroxylapatit in Kombination mit der Renaturierung durch Dialyse

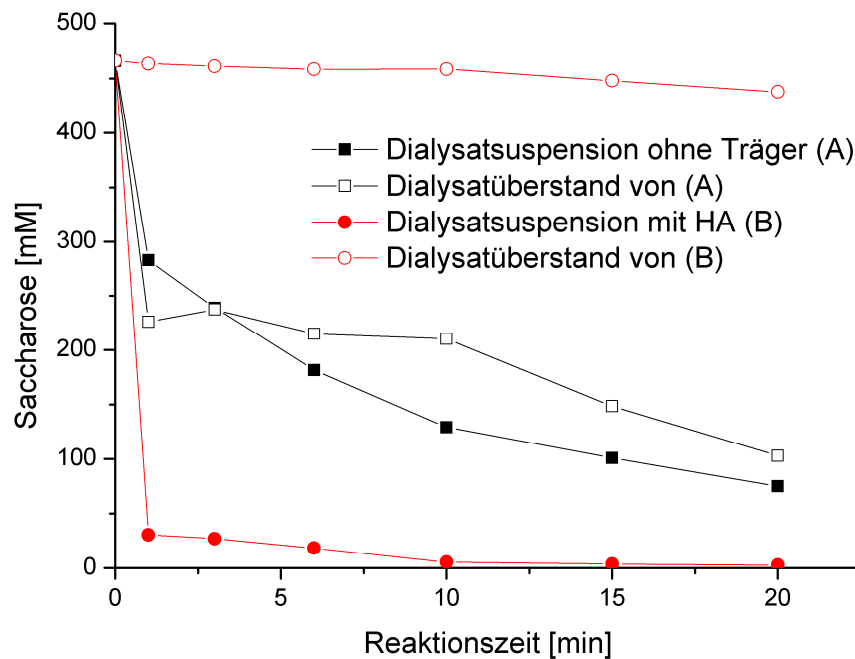


Abb. 10.13.1: Substratumsätze von Dialysatsuspension und -überstand für Resolubilisat mit 1,3 mgFTF/ml ohne Trägerzusatz und mit 8,0 mg/ml Hydroxylapatit

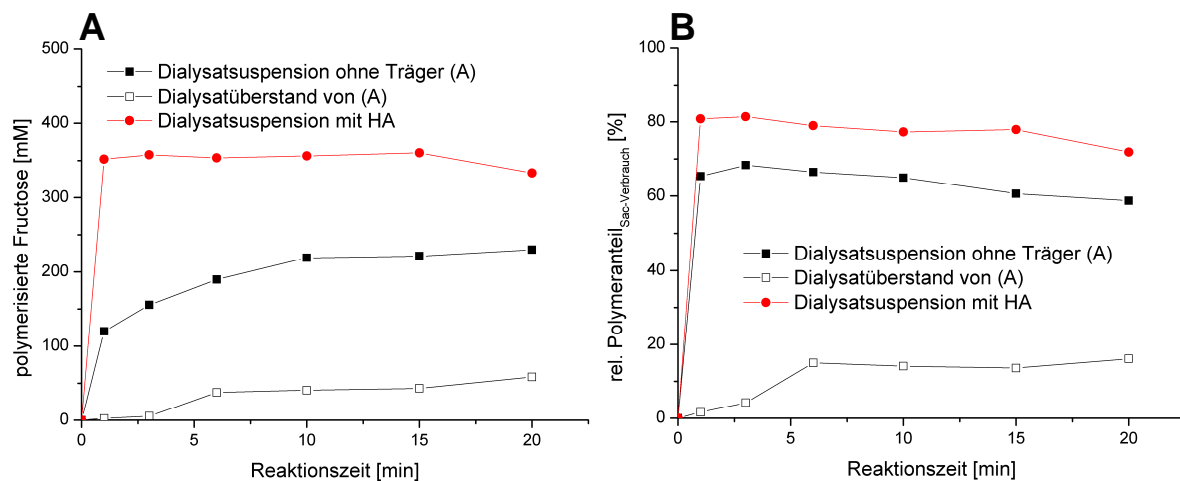


Abb. 10.13.2: Stoffliche Bilanzierung der Transfructosylierung mit Saccharose für die Suspension und den Überstand bei der trägervermittelten Rückfaltung. Das Resolubilisat mit 1,39 mgFTF/ml wird ohne Trägerzusatz und mit 8,0 mg/ml Hydroxylapatit eingesetzt: A: polymerisierte Fructose im Reaktionsverlauf, B: relativer Anteil polymerisierter Fructose in Bezug auf den Saccharoseumsatz.

10.14 Physikalische und chemische Identifizierung der FTF-Akzeptorprodukte sowie Parameter der Kernspinresonanz-Spektren

10.14.1 β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Mannopyranosid (ManFru) (Seibel *et al.*, 2005)

$[\alpha]_D +18,2^\circ$ (c 1,0, H₂O), Lichtenthaler (1997) $[\alpha]_D +19,1^\circ$ (c 1,2, H₂O); R_f 0,40 (6:3:1 EtOAc-Isopropanol-H₂O, 3 Durchläufe); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 5,30-5,29 (d, $J_{1,2}$ 1,9 Hz, 1H, 1-H), 4,14-4,12 (d, $J_{3',4'}$ 8,7 Hz, 1H, 3'-H), 4,02-3,99 (t, $J_{4',3'} = J_{4',5'}$ 8,7 Hz, 1H, 4'-H), 3,86-3,67 (m, 9 H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H₂, 5'-H, 6'-H₂), 3,61 (s, 1'-H₂). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 106,55 (C-2'), 96,18 (C-1), 83,93 (C-5'), 78,58 (C-3'), 76,51 (C-4'), 75,91 73,68 72,70 (C-2, C-3, C-5), 69,02 (C-4), 64,98 (C-6'), 63,55 (C-1'), 63,21 (C-6), ESIMS: m/z 365,0 100% [M + Na⁺].

10.14.2 β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Galactopyranosid (GalFru) (Seibel *et al.*, 2005)

Weißer Feststoff, Schmelzpunkt: 160°C, Feingold (1957) Schmelzpunkt: 174-177 °C; $[\alpha]_D +81,2^\circ$ (c 1,0, H₂O), Hough (1973) $[\alpha]_D +79,0^\circ$ (c 1,0, H₂O); R_f 0,42 (6:3:1 EtOAc-Isopropanol-H₂O, 3 Durchläufe); IR (cm⁻¹): 3428, 1132, 1087, 1049, 1017; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 5,40-5,39 (d, $J_{1,2}$ 3,9 Hz, 1H, 1-H), 4,18-4,15 (d, $J_{3',4'}$ 8,7 Hz, 1H, 3'-H), 4,11-4,07 (dt, $J_{5,4}$ 0,9, $J_{5,6}$ 6,4 Hz, 1H, 5-H), 4,04- 4,00 (t, 1H, $J_{3',4'} = J_{4',3'}$ 8,7 Hz, 4'-H), 3,99-3,98 (dd, $J_{4,5}$ 0,9, $J_{4,3}$ 3,20 Hz, 1H, 4-H), 3,89-3,86 (dd, $J_{3,2}$ 10,5, $J_{4,3}$ 3,20 Hz, 1H, 3-H), 3,85-3,76 (m, 3H, 2'-H, 5'-H, 6'-H₂), 3,70-3,68 (t, J 6,4 Hz, 2H, 6-H₂), 3,64 (s, 2H, 1'-H₂). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 106,2 (C-1'), 94,87 (C-1), 83,86 (C-5'), 79,12 (C-3'), 76,72 (C-4'), 73,99 (C-5), 71,70 (C-3), 71,67 (C-4), 70,55 (C-2), 64,93 (C-6'), 64,08 (C-1'), 63,44 (C-6). ESIMS: m/z 365,0 100% [M + Na⁺].

10.14.3 β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Xylopyranosid (XylFru) (Seibel *et al.*, 2005)

Weißer Feststoff, Schmelzpunkt: 120°C; $[\alpha]_D +59,5^\circ$ (c 1,1, H₂O), Avigad (1956) $[\alpha]_D +62^\circ$ (c 1,0, H₂O); R_f 0,46 (6:3:1 EtOAc-Isopropanol-H₂O, 2 Durchläufe); IR (cm⁻¹): 3412, 1121, 1046; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 5,30-5,29 (d, $J_{1,2}$ 3,6 Hz, 1H, 1-H), 4,17-4,15 (d, $J_{3',4'}$ 8,9 Hz, 1H, 3'-H), 4,07-4,02 (t, $J_{4',3'} = J_{4',5'}$ 8,9 Hz, 1H, 4'-H), 3,85-3,81 (dt, $J_{5',4'} = 8,9$, $J_{5',6'}$ 2,8 Hz, 1H, 5'-H), 3,78-3,74 (2d, $J_{6a',5'} = J_{6b',5'}$ 2,8 Hz, 2H, 6a'-H, 6b'-H), 3,68-3,60 (m, 2H, 3-H, 5-H), 3,60 (s, 2H, 1'-H₂), 3,56-3,54 (m, 1H, 4-H), 3,50-3,46 (dd, $J_{2,3}$ 9,9, $J_{2,1}$ 3,6 Hz, 1H, 2-H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 106,35 (C-2'), 94,97 (C-1), 84,01 (C-5'), 78,83 (C-3'), 76,26 (C-4'), 75,40 (C-3), 73,67 (C-2), 71,82 (C-4), 64,45 (C-6'), 64,38 (C-5), 63,48 (C-1'). ESIMS: m/z 335,0 100%, [M + Na⁺].

10.15 Physikalische und chemische Identifizierung der β -FF-Akzeptorprodukte sowie Parameter der Kernspinresonanz-Spektren

10.15.1 β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Mannopyranosid (ManFru₂) (Zuccaro *et al.*, 2008)

Weißer Feststoff, $R_f = 0,23$ (Acetonitril-H₂O 8:2, 3 Durchläufe); Schmelzpunkt: 108 °C (dec.)
¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5,31 (d, $J=1,6$ Hz, 1H; 1-H), 4,19-4,17 (d, $J=8,6$ Hz, 1H; 3'-H), 4,19-4,17 (d, $J=8,3$ Hz, 1H; 3''-H), 4,06-4,03 (t, $J=8,2$ Hz, 1H; 4''-H), 4,03-3,99 (t, $J=8,5$ Hz, 1H; 4'-H), 3,88-3,84 (m, 2H; 2-H, 5-H), 3,84-3,81 (m, 2H; 5'-H, 5''-H), 3,88-3,84 (m, 12H; 3-H, 4-H, 6-H₂, 1'-H₂, 6'-H₂, 1''-H₂, 6''-H₂). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 106,55 (C-2''), 106,09 (C-2'), 96,68 (C-1), 84,08 (C-5'), 83,89 (C-5''), 79,71 (C-3'), 79,56 (C-3''), 77,16 (C-4''), 76,76 (C-4'), 76,27 (C-3), 73,84 (C-2), 73,00 (C-5), 69,27 (C-4), 65,07 (C-6'), 64,98 (C-6''), 63,90 (C-1'), 62,52 (C-6), 63,41 (C-1). ESI-MS: m/z berechnet für C₁₈H₃₂O₁₆Na: 527,2, gemessen 527,2 [M+Na]⁺.

10.15.2 β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Mannopyranosid (ManFru₃) (Zuccaro *et al.*, 2008)

Weißer Feststoff, $R_f = 0,18$ (Acetonitril-H₂O 8:2, 3 Durchläufe); Schmelzpunkt: 148 °C (dec.);
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 5,31 (d, $J=1,2$ Hz, 1H; 1-H), 4,21-4,19 (d, $J=8,5$ Hz, 1H; 3'''-H), 4,19-4,17 (d, $J=8,7$ Hz, 1H; 3'-H), 4,16-4,14 (d, $J=8,6$ Hz, 1H; 3''-H), 4,08-4,05 (t, $J=8,5$ Hz, 1H; 4''-H), 4,06-4,03 (t, $J=8,5$ Hz, 1H; 4'''-H), 4,03-3,99 (t, $J=8,5$ Hz, 1H; 4'-H), 3,87-3,84 (m, 2H; 2-H, 5-H), 3,84-3,79 (m, 5H; 5'-H, 5''-H, 1'''-H_a, 5'''-H, 6'''-H_a), 3,79-3,75 (m, 5H; 3-H, 6-H_a, 1'-H_a, 6''-H₂), 3,74-3,69 (m, 6H; 6-H_b, 1'-H_b, 6'-H₂, 1''-H_a, 6'''-H_b), 3,68-3,62 (m, 2H; 4-H, 1''-H_b), ¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ 106,46 (C-2''), 106,01 (C-2'), 105,88 (C-2'''), 96,61 (C-1), 84,02 (C-5'), 83,82 (C-5''), 83,79 (C-5'''), 80,01 (C-3'''), 79,58 (C-3'), 79,46 (C-3''), 77,05 (C-4''), 76,97 (C-4'''), 76,61 (C-4'), 76,20 (C-3), 73,77 (C-2), 72,90 (C-5), 69,17 (C-4), 65,00 (C-6'), 64,91 (C-6''), 64,81 (C-6'''), 63,86 (C-1'), 63,65 (C-1'''), 63,42 (C-6), 63,22 (C-1'). ESI-MS: m/z berechnet für C₂₄H₄₂O₂₁Na: 689,2, gemessen 689,2 [M+Na]⁺.

10.15.3 β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Galactopyranosid (GalFru₂) (Zuccaro *et al.*, 2008)

Weißer Feststoff, $R_f = 0,22$ (Acetonitril-H₂O 8:2, 3 Durchläufe); Schmelzpunkt: 118 °C (dec.);
¹H NMR (600 MHz, D₂O): δ 5,42 (dd, $J=4,0$ 1,8 Hz, 1H; 1-H), 4,24-4,22 (dd, $J=8,8$, 2,1 Hz, 1H; 3'-H), 4,15-4,13 (dd, $J=8,6$, 2,1 Hz, 1H; 3''-H), 4,09-4,08 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, 5-H), 4,05-4,02 (dt, $J=8,4$, 2,1 Hz, 1H; 4''-H), 4,02-3,99 (t, $J=8,7$, 2,1 Hz, 1H; 4'-H), 3,98-3,96 (m, 1H, 4-H), 3,88-3,85 (ddd, $J=10,5$, 3,3, 2,0, 1H; 3-H), 3,84-3,81 (m, 2H; 5'-H, 5''-H), 3,80-3,70 (m,

236

12H; 6-H₂, 6'-H₂, 6''-H₂), 3,71-3,68 (m, 1H, 6''-H_b), 3,72-3,65 (m, 2H, 6'-H₂), 3,65-3,62 (dd, $J=12,3, 2,1$ Hz, 1H, 6''-H_a). ¹³C NMR (150 MHz, D₂O): δ 106,47 (C-2''), 105,90 (C-2'), 95,35 (C-1), 83,56 (C-5', C-5''), 79,42 (C-3'), 79,33 (C-3''), 77,18 (C-4''), 76,59 (C-4'), 74,19 (C-5), 71,87 (C-4), 71,82 (C-3), 70,78 (C-2), 65,07 (C-6''), 64,88 (C-6'), 63,68 (C-1''), 63,59 (C-6), 63,41 (C-1'). ESI-MS: m/z : berechnet für C₁₈H₃₂O₁₆Na: 527,2, gemessen 527,2 [M+Na]⁺.

10.15.4 β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Galactopyranosid (GalFru₃) (Zuccaro *et al.*, 2008)

Weißer Feststoff, $R_f = 0,17$ (Acetonitril-H₂O 8:2, 3 Durchläufe); Schmelzpunkt: 225 °C (dec.). ESI-MS: m/z : berechnet für C₂₄H₄₂O₂₁Na: 689,2, gemessen 689,2 [M+Na]⁺.

10.15.5 β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Xylopyranosid (XylFru₂) (Zuccaro *et al.*, 2008)

Gelblich-roter Feststoff, $R_f = 0,29$ (Acetonitril-H₂O 8:2, 3 Durchläufe); Schmelzpunkt: 108 °C (dec.); ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 5,33 (d, $J=3,9$ Hz, 1H; 1-H), 4,23-4,21 (d, $J=8,8$ Hz, 1H; 3'-H), 4,14-4,12 (d, $J=8,5$ Hz, 1H; 3''-H), 4,07-4,02 (t, $J=8,6$ Hz, 1H; 4'-H), 4,04-4,00 (t, $J=8,2$ Hz, 1H; 4''-H), 3,86-3,78 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 3,79-3,69 (m, 4H, 6''-H₂, 1'-H_a, 6'-H_a), 3,68-3,59 (m, H, 1'-H_a, 6'-H_a, 1''-H₂, 5-H₂, 3-H, 4-H), 3,50-3,46 (dd, $J=9,7, 3,9$ Hz, 1H, 2-H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ 106,12 (C-2', C-2''), 95,47 (C-1), 84,11 (C-5'), 83,94 (C-5''), 79,43 (C-3', C-3''), 77,25 (C-4''), 76,39 (C-4'), 75,65 (C-3), 73,98 (C-2), 72,05 (C-4), 65,15 (C-6''), 64,69 (C-5), 64,55 (C-6'), 63,47 (C-1'), 63,21 (C-1''). ESI-MS: m/z : berechnet für C₁₇H₃₀O₁₅Na: 497,2, gemessen 497,2 [M+Na]⁺.

10.15.6 β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- β -D-Fructofuranosyl-2,1- α -D-Xylopyranosid (XylFru₃) (Zuccaro *et al.*, 2008)

Gelblich-roter Feststoff, $R_f = 0,22$ (Acetonitril-H₂O 8:2, 3 Durchläufe); Schmelzpunkt: 116 °C (dec.). ESI-MS: m/z : berechnet für C₂₃H₄₀O₂₀Na: 659,2, gemessen 659,2 [M+Na]⁺.